

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 1932

THÈSE

N° 6

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1932

PAR

Lucien POVÉRO

Né le 17 Juillet 1908, à San Damiano d'Asti (Italie)

LE CHARBON BACTÉRIDIE

VIRULENCE ET RECEPTIVITE

JURY } *Président* : LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine
 } *Assesseurs* : PANISSET { Professeurs à l'Ecole Nationale
 LESBOUYRIES { Vétérinaire d'Alfort

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1932

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 1932

THÈSE

N°

6

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1932

PAR

LUCIEN POVERO

Né le 17 Juillet 1908, à San Damiano d'Asti (Italie)

LE CHARBON BACTÉRIDIIEN
VIRULENCE ET RECEPTIVITE

JURY } *Président* : LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine
 } *Assesseurs* : PANISSET { Professeurs à l'Ecole Nationale
 LESBOUYRIES { Vétérinaire d'Alfort

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1932

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

• Directeur : M. E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général
honoraire des Ecoles Vétérinaires ; P.-J. CADIOT,
H. VALLÉE

PROFESSEURS ET CHARGES DE COURS

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques..	BRESSOU.
Physiologie, thérapeutique générale.....	MAIGNON.
Physique et Chimie médicales, toxicologie, pharmacie.....	NICOLAS.
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique; Zoologie.	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique; sémiologie et propédeutique, jurisprudence.	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; anatomie chirurgicale. médecine opératoire et ferrure.....	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique; médecine opératoire, obstétrique.	LESBOUYRIES.
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique..	PANISSET.
Histologie et embryologie, anatomie pathologique ; autopsies.....	PETIT.
Zootecnie et économie rurale.....	DECHAMBRE
Agronomie, botanique et hygiène; matière médicale.	DECHAMBRE et HENRY.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale.	VERGE.

PROFESSEUR AGREGÉ

M. LESBOUYRIES

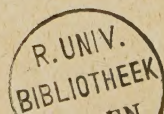
CHEF DE TRAVAUX AGREGÉ

M. SIMONNET

CHEFS DE TRAVAUX

MM. BRION, GORET, MONVOISIN, MOUSSU (R.), VALADE

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les
opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées
doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles
n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.



A MA MERE

A MON PERE

Vétérinaire Inspecteur du Service de l'Elevage au Maroc

*Ce faible témoignage de ma vive affection et
de ma reconnaissance infinie.*

A MON FRERE

• *Affectueusement.*

A TOUS MES PARENTS

A TOUS MES AMIS

A MONSIEUR LE VÉTÉRINAIRE COLONEL SCHULLER
Directeur des Services Vétérinaires Militaires au Maroc

Très respectueusement.

A MONSIEUR LE VÉTÉRINAIRE CAPITAINE VELU
Directeur du Laboratoire de Recherches
du Service de l'Elevage au Maroc

*Respectueux remerciements pour les précieux
conseils qu'il nous a prodigués et pour l'in-
térêt bienveillant qu'il n'a cessé de nous
manifeste.*

A MONSIEUR ZOTTNER
Docteur Vétérinaire,
Inspecteur du Service de l'Elevage du Maroc ;
adjoint au Chef du Laboratoire de Recherches

A MONSIEUR PETITDIDIER
Docteur Vétérinaire
Inspecteur du Service de l'Elevage du Maroc ;
adjoint au Chef du Laboratoire de Recherches

*En remerciement de l'aide précieuse qu'ils ont
bien voulu nous apporter dans l'exécution
de ce travail.*

A TOUS NOS MAITRES
de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

A NOS MAITRES
de l'Ecole Militaire et d'Application de Cavalerie de Saumur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMIERRE

De la Faculté de Médecine de Paris

*Nos remerciements pour le très grand honneur
qu'il nous a fait en acceptant la Présidence
du Jury de notre Thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET

Chevalier de la Légion d'honneur
Professeur des Maladies contagieuses
à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort

*Nous adressons ici nos remerciements sincères
et l'expression de notre profonde gratitude
pour tout l'intérêt affectueux qu'il n'a jamais
cessé de nous manifester pendant notre
séjour à l'Ecole.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LESBOUYRIES

Chevalier de la Légion d'honneur
Professeur de Pathologie Bovine à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort

*Nos remerciements d'avoir bien voulu nous
faire l'honneur de faire partie de notre Jury.*

AVANT-PROPOS

Fixé au Maroc depuis de longues années et placé dans des conditions qui nous permettaient de pouvoir observer et suivre de très près les diverses affections épizootiques qui sévissent dans ce pays sur le cheptel bovin, nous avons le choix entre de nombreux sujets d'étude susceptibles de répondre aux conditions exigées d'une thèse de doctorat.

Nous avons choisi la question du Charbon bactérien parce que c'est celle qui nous a semblé la plus intéressante, au moins du point de vue où nous l'avons envisagée.

A dessein nous avons laissé de côté tout ce qui a rapport aux mesures prophylactiques relatives à la dissémination de la maladie par les animaux sauvages : chiens errants, chacals, renards, oiseaux rapaces, qui rendent bien souvent illusoires toutes les mesures ayant pour but la suppression de l'agent causal dans un pays où l'incurie notoire et innée des indigènes empêche la destruction des cadavres virulents.

Nous nous sommes limité plus particulièrement dans l'étude de la virulence de la bactérie charbonneuse dans tous ses détails, avec l'espoir de pouvoir en dégager tout le côté pratique susceptible de conduire à une méthode d'immunisation capable de constituer une prophylaxie efficace, simple et pratique.

Avant de pénétrer dans le vif de notre sujet, nous tenons à adresser d'abord l'expression de notre profonde reconnaissance à tous ceux qui ont bien voulu nous aider dans notre tâche :

A Monsieur le Professeur PANISSET, de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, l'inspirateur de cette thèse, qui a bien voulu nous honorer de son amitié, nous aider de ses conseils et qui n'a

jamais cessé de nous manifester un intérêt bienveillant dont nous lui en resterons profondément reconnaissant.

A Monsieur LEFEVRE, directeur général de l'Agriculture, du Commerce et de la Colonisation au Maroc; au vétérinaire-colonel MONOD qui nous a toujours témoigné la plus grande bienveillance, ainsi qu'à Monsieur LESAGE, docteur-vétérinaire, vétérinaire principal, chef du Service de l'Elevage du Maroc, et à Monsieur HERZOG, vétérinaire principal, qui nous ont ouvert l'accès du Laboratoire de Recherches du Service de l'Elevage.

Enfin nous adressons nos remerciements sincères, avec l'expression de notre très vive gratitude à Monsieur le vétérinaire-capitaine VELU, chef du Laboratoire de Recherches du Service de l'Elevage à Casablanca, qui, par ses conseils avertis et éclairés, nous a guidé dans nos recherches, nous a initié aux bonnes méthodes de la technique expérimentale qui nous ont permis de réaliser et de mener à bonne fin un travail dont les difficultés étaient considérables pour un étudiant encore peu familiarisé avec la bactériologie, ainsi qu'à Monsieur le docteur-vétérinaire ZOTTNER, adjoint au chef du Laboratoire, et à Monsieur le docteur PETITDIDIER, vétérinaire inspecteur de l'Elevage, qui nous ont bien souvent aidé dans la réalisation pratique d'expériences délicates fort longues, qui, dans certains cas, ont duré plusieurs mois et même plusieurs années.

PREFACE

De toutes les nombreuses maladies infectieuses et septicémiques qui affectent le plus sévèrement nos animaux, le *Charbon bactérien* ou *Fièvre charbonneuse* est l'une des plus répandues dans le temps et dans l'espace. De nos jours encore elle persiste en mainte région, malgré la vaccination et des mesures sanitaires les plus énergiques. Sa fréquence et surtout sa gravité, tant au point de vue pathologique qu'au point de vue économique, dans tous les pays d'élevage, font que cette affection, connue depuis très longtemps, a été l'objet de travaux nombreux et importants, depuis plus d'un demi-siècle, époque à laquelle son étiologie fut définie d'une façon précise par RAYER et DAVAINÉ qui découvrirent en 1850 le *bacillus anthracis*, agent de la *fièvre charbonneuse*, dans le sang d'animaux (moutons) morts de cette infection.

Ce fut le point de départ de découvertes importantes dont la liste ne cessa de s'allonger d'année en année. Depuis lors de nombreux savants se sont efforcés de préciser le plus possible l'étiologie, la pathogénie et la prévention de cette redoutable infection. Chacun apporta dans cette étude ses facultés personnelles et ses méthodes fructueuses. Bien des points furent élucidés et l'on pourrait croire que le sujet est à peu près épuisé à l'heure actuelle, que tout a été dit sur le rôle et l'action de *bacillus anthracis*, en un mot que la question du charbon n'est plus à envisager.

« Telle qu'elle nous a été léguée par DAVAINÉ, KOCH, PASTEUR et ses collaborateurs, elle peut être considérée comme définitivement résolue. »

Il nous a semblé cependant que dans l'immense synthèse bibliographique constituée par les écrits des divers auteurs qui se sont intéressés à la question, certains points particuliers et importants ayant trait plus particulièrement à la *virulence de bacillus anthracis*, avait été approfondis d'une façon moins absolue et moins complète que d'autres. Si les divers aspects et particularités de la maladie ont été tous envisagés, ils ne l'ont pas été tous au même degré et il nous a paru que la question de la Virulence pouvait encore donner lieu à quelques recherches originales.

C'est ainsi que l'on a toujours admis comme un dogme, à la suite des expériences de CHAUX, tendant à démontrer la résistance du mouton nord-africain au *bacille charbonneux*, que la fièvre charbonneuse n'existait pas en Afrique du Nord et il a fallu les expériences concluantes de FLEURY, LHERITIER et TRIBOUT, réalisées à l'*Institut Pasteur d'Alger*, pour démontrer que, tout comme la France, l'Afrique du Nord a ses « champs maudits » *nettement localisés*, que le charbon bactérien sévit avec une acuité aussi grande ici que là.

Les observations cliniques, confirmées par les recherches du laboratoire ont par la suite permis de constater la fréquence des épizooties. Le nombre sans cesse croissant de vaccinations anticharbonneuses pratiquées chaque année sur les troupeaux de l'Algérie, de la Tunisie et du Maroc, prouve assez par ailleurs, combien la *fièvre bactérienne* y est répandue et redoutée.

D'autre part les auteurs qui, expérimentalement, ont étudié la question de la virulence de *bacillus anthracis* ne semblent pas d'accord — et leurs expériences le prouvent — sur la nature et les doses de matériel virulent à injecter pour obtenir une réaction déterminée, notamment pour apprécier la valeur des diverses méthodes et procédés de vaccination.

C'est dans ce but pratique que nous avons entrepris ces recherches et essayé de préciser ainsi le problème de la *Virulence* du germe charbonneux. Mais avant d'aborder notre sujet,

il nous semble indispensable pour la clarté de nos conclusions, de préciser un point de terminologie, de définir le mot *Virulence*. Quoiqu'il soit difficile de préciser un terme qui ne comporte pas en lui-même un sens classique précis et immuable, nous nous arrêterons, à ce point de vue, au sens qui nous aura paru le plus rationnel.

Prise à la lettre, la « virulence » est étymologiquement l'action, la qualité pathogène d'un virus. C'est là une définition concise certes, mais incomplète et partant, insuffisante.

Sans entrer en effet dans le problème de l'origine de la virulence, il semblerait qu'il n'existe pas de *virulence* absolue proprement dite et que cette propriété des microbes est liée à des facteurs dont il faut tenir compte dans sa détermination et sa mesure.

On a dit « que la virulence était l'aptitude végétative d'un micro organisme vis-à-vis d'un animal donné, cette propriété ne pouvant être que très imparfaitement définie par le degré ultime de dilution ou la culture de ce germe est encore infestante » (1).

Peut-être y aurait-il lieu d'approfondir cette définition et la *virulence* pourrait être envisagée, semble-t-il, comme « l'ACTION PATHOGENE D'UNE DILUTION DONNEE, D'UNE CULTURE BIEN DEFINIE D'UN MICROBE PARTICULIER, VIS-A-VIS D'UN ORGANISME QUI SE DEFEND ET UN MICROBE QUI ATTAQUE : LA RESISTANCE DE CE CONFLIT EXPRIME LA VIRULENCE ».

Cette propriété des microbes a une relation indéniable avec la réceptivité de leurs hôtes. Ce n'est pas une propriété inhérente seulement à l'espèce microbienne considérée ; c'est tout autant une propriété essentiellement variable, contingente, qui se manifeste seulement dans certaines circonstances précises et sous des conditions bien déterminées. Elle ne peut en aucun cas être appréciée en elle-même puisqu'il y a défense du récepteur de germes, défense qui s'exprime par des réactions variables suivant les individus. D'où il résulte que l'étude d'un germe vivant, pathogène, ne peut être séparée de celle des

individus qui le reçoivent. Toujours, ce terme de virulence doit être envisagé en rapport avec la dualité qu'il exprime et nous pouvons dès lors conclure :

« Que la virulence n'apparait pas comme une propriété inhérente à un micro-organisme mais comme un rapport entre les aptitudes pathogènes d'un germe donné et la réceptivité d'un individu également donné. Il faut, lorsque l'on parle de virulence d'un germe, ne pas faire entrer seulement l'idée de l'agent extérieur, mais mettre en ligne de compte l'organisme réceptif. *C'est dire que la virulence est par rapport au microbe ce qu'est la maladie par rapport à l'organisme, l'un étant la cause, l'autre l'effet, mais aucun des deux ne pouvant se concevoir sans l'autre.* »

C'est conformément à cette définition que nous avons envisagé l'étude de la virulence de *bacillus anthracis* en étudiant dans tous les cas d'une façon inséparable, le matériel virulent d'une part, l'organisme réceptif d'autre part.

*
* *

Nous avons ainsi été amené à envisager successivement les points suivants :

I. — *La virulence de « Bacillus anthracis » en fonction du germe.* — Cette étude implique :

1° L'examen des conditions dans lesquelles les inoculations expérimentales ont été pratiquées par les différents auteurs (Chapitre I).

2° La recherche d'une technique d'inoculation susceptible de donner des résultats constants et comparables (Chapitre II).

3° L'étude de la virulence en fonction du germe, grâce à la technique mise au point (Chapitre III).

II. — *La virulence en fonction de l'organisme infecté.*

1° Du point de vue de l'individu.

2° Du point de vue de l'espèce.

3° Du point de vue de la race (Chapitre IV), question très importante puisque c'est sur elle que repose tout entier le problème de la vaccination contre le *charbon bactérien*.

CHAPITRE PREMIER

LE MATERIEL VIRULENT DANS LES INOCULATIONS EXPERIMENTALES

(Historique)

Avant d'exposer nos propres recherches sur l'obtention d'un matériel virulent stable et bien défini, il nous a semblé nécessaire de jeter un regard rétrospectif sur les méthodes d'inoculations expérimentales mises en œuvre durant ces dernières années, afin de connaître le matériel employé et le but de ces inoculations. Notre étude a porté principalement sur les travaux de ces derniers temps et particulièrement sur les moyens employés pour mettre en évidence la virulence de *bacillus anthracis*, sur le matériel dont les auteurs se sont servis pour les inoculations infectantes ou vaccinales, ou encore pour les inoculations d'épreuve. L'impression générale qui se dégage de ces recherches bibliographiques est la variété considérable dans les techniques employées et les résultats obtenus, en vue de buts cependant semblables, et aussi le manque de précision au sujet des méthodes utilisées. Nous exposerons succinctement les plus caractéristiques.

Certains auteurs ont employé comme matériel virulent du *sang d'animaux morts de charbon* et la première expérience en date remonte à l'époque déjà lointaine où la question du charbon faisait ses premiers pas. Nous envisageons ici l'expérience qui devait valoir à son auteur une polémique si ardente de la part de ses contemporains et qui devait faire dire à P. BERT ces mots :

« Je puis faire périr la bactériidie dans la goutte de sang par 1' 0² comprimé, inoculer ce qui reste et reproduire la maladie et la mort sans que la bactériidie ne se montre. Donc les bactériidies ne sont ni la cause, ni l'effet nécessaire dans la maladie charbonneuse. »

C'est de l'expérience de DAVAINÉ qu'il s'agit. Nous montrons en l'exposant brièvement ce qu'était à cette époque de début et d'enfance la technique microbiologique et comment on la comprenait.

L'expérience qui devait par la suite donner naissance aux travaux les plus importants sur la question de la *fièvre charbonneuse* fut publiée en 1863 par DAVAINÉ (2) dans une note relative aux *expériences* ayant pour but de prouver que la bactériidie constituait seule le virus charbonneux.

Cette expérience la voici :

« Quelques gouttes de sang charbonneux desséché sont délayées dans 50 centimètres cubes d'eau distillée en un vase étroit. Après vingt-quatre heures, les bactériidies ont gagné le fond. L'eau de la moitié supérieure est remplacée plusieurs fois successives dans le but de pallier à la putréfaction. Ce liquide supérieur est transparent. Injecté à un cobaye, l'animal reste indemne. Une goutte du liquide inférieur, trouble, inoculé à un autre cobaye, provoque la mort par charbon. »

C'est là l'expérience qui devait prouver « que la maladie n'est PAS EN NOUS, DE NOUS ET PAR NOUS COMME ON LE CROYAIT À L'ÉPOQUE MAIS QU'ELLE EST HORS DE NOUS. »

Nous devons rectifier : *Elle est aussi en nous*, selon notre définition de la virulence, et nous le démontrerons par la suite.

DAVAINÉ s'était adressé au liquide vital par excellence : au sang. Il ne fut pas le seul et un peu plus tard, en 1879, TOUSSAINT (3) expérimente sur la virulence de *bacillus anthracis* vis-à-vis du lapin et divers autres animaux avec du sang de diverses origines. Il inocule pour étudier la *nature parasitaire* du charbon, un lapin, avec du *sang de rate de mouton mort de charbon*. Un autre lapin est inoculé avec du sang d'une tumeur abdominale du même mouton. Quand il ne se sert

pas de sang d'organes, TOUSSAINT emploie le *sang frais d'un lapin mort de charbon en vingt-deux heures* ou du *sang frais d'un lapin qui allait mourir de charbon*. Il constate par ailleurs que la mort arrive plus ou moins rapidement selon que le sang est plus ou moins frais.

Tout au long des différents chapitres de son livre, dans toutes ses expériences, le matériel virulent a pour base le sang charbonneux. Et c'est tantôt le *sang du cœur d'une brebis morte de charbon depuis la veille* qu'il injecte, à l'âne dans le but de vérifier sa réceptivité : tantôt *vingt gouttes du liquide péritonéal d'un lapin, renfermant une grande quantité de bactériidies*. Ailleurs, il injecte au chien dans le but d'expérimenter au point de vue des réactions locales, *cent cinquante centimètres cubes de sang d'un lapin en coma charbonneux, inoculé depuis la veille*.

Enfin dans une tentative d'immunisation contre le charbon, TOUSSAINT (4) inocule cinq moutons *avec trois centimètres cubes de sang charbonneux défibriné, chauffé à 55° pendant dix minutes*. Ces animaux résistent ensuite à une *inoculation virulente* qui tue les témoins.

Nous avons insisté sur ces données expérimentales, et les avons rapportées avec un souci constant d'exactitude pour démontrer, nous l'avons dit, ce qu'était à son début la technique bactériologique. Cependant toutes ces expériences qui font honneur à leurs auteurs et qui ont servi à la renommée de leur nom, tout en ayant été conduites avec le plus grand soin possible, ne semblent pas avoir une importance pratique indiscutable, par suite du caractère d'imprécision qu'elles présentent, prises en elles-mêmes, et ce fait enlève une partie de leur valeur aux résultats indiqués. En effet, le matériel virulent doit être quelque chose de *précis, de bien défini, tant au point de vue qualitatif que quantitatif*, et se rapporter à un *organisme déterminé par des réactions données*. Dans ces expériences on ne rencontre rien de tel.

Dès expressions comme « *quelques gouttes de sang char-*

bonneux, du sang de rate d'un mouton, ou d'un lapin mort en vingt-deux heures, de charbon ; du sang d'un lapin en coma charbonneux, » etc., n'offrent pas du point de vue de la virulence, une garantie assez sûre, et n'indiquent pas un matériel bien défini pouvant donner en toutes circonstances des résultats comparables. Mais ceci est peut-être moins imputable aux auteurs eux-mêmes, qu'à leur époque et aux moyens dont ils disposaient. La microbiologie prenait à peine son essor ; elle se créait à peine dans sa technique et ses méthodes et l'on ne peut exiger dans les expériences d'alors toute la rigueur, toute l'exactitude que nous y rencontrons aujourd'hui.

Aussi avons-nous entrepris d'autres recherches bibliographiques dans les publications les plus récentes pour nous rendre compte si réellement — du moins du point de vue particulier des inoculations expérimentales qui sont souvent la base des découvertes les plus importantes, et sur le sujet qui nous intéresse, à savoir : *la virulence de la bactériidie charbonneuse* — le chapitre sur le charbon en général est demeuré immuable, tel que nous l'ont légué DAVAINÉ, TOUSSAINT et les premiers expérimentateurs, si la technique des inoculations est restée ce qu'elle était, ou si au contraire elle a bénéficié du Progrès général.

Et à tout prendre nous devons constater que cette technique n'a pas varié ; l'exposé d'expériences plus récentes le démontrera éloquemment. Une remarque générale s'impose ici : il faut spécifier en effet que dans la plupart des cas les auteurs qui se sont occupés d'étudier expérimentalement la virulence de la *Bactériidie* l'ont fait pour vérifier le degré d'immunisation d'un animal ou éprouver la valeur d'une méthode de sérumsation ou de vaccination, en dehors toutefois des expériences de CHAUVÉAU et de FLEURY, LHERITIER et TRIBOUT qui avaient pour but de vérifier la *réceptivité* du mouton algérien à la bactériidie.

Dans le domaine « moderne », l'expérimentation est variable

d'un auteur à l'autre et nous distinguerons les inoculations faites avec des produits virulents (sang-liquide d'œdème, pulpe d'organes), les inoculations faites avec des cultures virulentes en bouillon ou sur gélose, les inoculations d'animaux sensibles avec des vaccins pasteurien.

1° *Inoculations avec produits virulents*

A. — *SANG.* — Le sang provenant d'animaux inoculés avec la bactériémie charbonneuse a été utilisé par un très grand nombre d'auteurs. C'est ainsi que BESREDKA et de TREVISE (5) utilisent du sang provenant du cœur de cobayes inoculés par voie cutanée avec 1/10 à 1/100 de centimètre cube de culture de vingt-quatre heures en bouillon, pour vérifier si des cobayes vaccinés par la peau sont réfractaires aux doses de 1/50 à 1/100 de gouttes de ce sang. Ils éprouvent des cobayes vaccinés par les vaccins pasteurien et 1/10 à 1 centimètre cube de virus par quatre gouttes de sang virulent, inoculées sous la peau.

EICHORN (6) éprouve l'immunité vaccinale de ses moutons et de ses bœufs, par injection sous-cutanée de sang de cobaye mort « avec la souche la plus virulente », à la dose de 0 cc. 25 chez le bœuf et 0 cc. 125 chez le mouton. Pour étudier le mécanisme de l'infection charbonneuse, COMBIESCO (7) inocule des lapins par voie sous-cutanée avec 1 centimètres cube de sang charbonneux maintenu à 37° pendant cinq heures. GRATIA (8) démontre que l'on peut facilement inoculer le charbon au lapin par voie sanguine en injectant 0,25 centimètres cubes à 0,5 « de sang virulent » prélevé dans le cœur d'un lapin qui vient ou est sur le point de mourir de septicémie charbonneuse. RIVALIER (9), en 1924, étudiant l'infection charbonneuse, injecte au cobaye, par voie péritonéale, du sang charbonneux ; par la voie sanguine, intracardiaque plus exactement, il inocule au cobaye du *sang charbonneux dilué et riche en bactéries* aux doses successives de 1/20, 1/2000, 1/16000,

1/20000 centimètres cubes, dans le but d'étudier l'infection du cobaye par *bacillus anthracis*.

Ces expériences, on peut s'en rendre compte, faites avec comme matériel virulent, du sang, ne diffèrent pas sensiblement de celles de TOUSSAINT, du point de vue de la technique d'une part, du point de vue de la précision, d'autre part dans la nature et la dose du matériel utilisé.

B. — INOCULATIONS FAITES AVEC DU LIQUIDE D'ŒDEME. — Ce matériel virulent a été employé également par de nombreux auteurs en vue d'étudier la virulence de la bactérie ou la réceptivité de certains animaux. C'est ainsi que HRUSKA (10), en 1926, pour ses recherches expérimentales sur le charbon bactérien utilise du *liquide d'œdème* charbonneux provenant de cobayes et de lapins, centrifugé et chauffé à 96°, ou encore du liquide d'œdème de cobayes morts après injection de deuxième vaccin charbonneux, formolé et filtré. Pour ses réactions d'épreuve il emploie également deux centimètres cubes de *liquide d'œdème formolé* par la voie intradermique, puis 2 centimètres cubes du même produit stérile et dilué dans l'eau distillée.

URBAIN et ROSSI (11), la même année, essaient de vacciner le cobaye avec du liquide d'œdème charbonneux injecté par diverses voies : veineuse, péritonéale, sous-cutanée, à la dose de 1 centimètre cube de ce produit. En 1927, ces mêmes auteurs recherchent si le lapin est à son tour justiciable du même procédé, en employant la peau comme voie d'introduction. RIVALIER (12), inocule à trois cobayes une goutte d'œdème charbonneux.

C. — INOCULATIONS FAITES AVEC DES EXTRAITS D'ORGANES. — D'autres auteurs, parfois les mêmes, utilisant alors un matériel virulent varié pour un même groupe d'expériences, se sont servis de substances provenant d'*organes* ou d'*extraits d'organes* d'animaux atteints de fièvre charbonneuse, malades ou cadavres.

DITTHORN (13), en 1906, après plusieurs passages de *bacilles virulents* constate que chez la grenouille, inoculée avec le produit d'un vingt-cinquième passage, la *bactéridie* extraite du foie après trois mois tue encore la souris en quarante deux heures. TRINCAS (14), en 1908, constate que l'injection intra-veineuse ou sous-cutanée « du *filtrat de liquide pleural virulent* » obtenu du lapin, à des cobayes, les tue en quelques jours avec des lésions charbonneuses. Les cobayes sont immunisés contre des doses dix fois mortelles de ce produit par injection répétée de doses non mortelles.

HRUSKA (15) se sert pour ses injections virulentes *d'extraits* de rate, de foie, de cobayes charbonneux, ainsi que d'extraits de rate charbonneuse de bovidés ayant succombé au charbon.

Enfin BOQUET (16), en 1928, injecte à des cobayes, sous la peau de l'extrémité d'une patte postérieure « 0,2 centimètres cubes d'une suspension virulente constituée véritablement par 1/5 d'une rate charbonneuse 2° vaccin de cobaye, broyée avec du sable et additionnée de 20 centimètres cubes d'eau physiologique. »

Ce sont les principales expériences que nous avons voulu révéler, se rapportant à l'utilisation de matériel virulent provenant d'animaux malades ou morts de fièvre charbonneuse. Dans aucun des trois paragraphes ci-dessus nous ne trouvons la précision que l'on était en droit d'espérer sur la nature du produit employé, précision envisagée du point de vue bien entendu, d'une virulence *stable, bien déterminée et constante.*

**2° Inoculations expérimentales
faites avec des cultures virulentes,
en bouillon ou gelose.**

Nous aurons l'occasion de revenir sur l'imprécision manifeste relevée ci-dessus, dans les chapitres qui suivront, lorsqu'il s'agira du contrôle du matériel employé, et nous allons

examiner un autre groupe d'expériences où l'on a utilisé un matériel virulent différent.

Il s'agit des inoculations faites avec des cultures de bacilles charbonneux où, en dehors des expériences d'ingestion de produits virulents, bactériidies ou spores, les auteurs parlent indifféremment de « *culture virulente* » en bouillon ou sur gélose.

C'est ainsi que de CHRISTMAS (17), en 1905, essaie d'immuniser le rat blanc contre le charbon, par une souche dépourvue de toute virulence pour cet animal même par l'injection de 1 *centimètre cube de culture épaisse*. L'épreuve est faite par 1 centimètre cube d'une émulsion dans l'eau d'une *culture fraîche sur gélose* d'une bactéridie sporogène à virulence exaltée par passages dans l'organisme de rats blancs.

URBAIN et ROSSI (18), dans leurs essais de vaccination de lapins par le liquide d'œdème virulent, éprouvent les animaux avec, d'une part, « 1/1000 *de centimètre cube d'une culture de bactériidies en bouillon* », tuant le lapin à la dose de 1/10.000 de centimètre cube, soit dix doses mortelles, et, d'autre part, « 1/500 *de centimètre cube de la même culture* ». GIUSTI (19), en 1905, prouve la résistance naturelle du renard affaibli par quatre jours de jeûne à l'infection par voie péritonéale ; « *de 5 centimètre cubes de culture de trente-six heures en bouillon* » et démontre l'inefficacité de 5 à 7 centimètres cubes de sérum de renard pour préserver un lapin contre « 0,5 *centimètres cubes de l'émulsion d'une culture de 8 heures sur gélose* ».

J. d'AGATA (20), en 1910, emploie pour établir un mélange avec des bacilles pyocyaniques, en vue de procéder à une vaccination d'ovins, « *un bouillon dans lequel une bactéridie très virulente a cultivé pendant 24 à 36 heures* ». Les réactions d'épreuve ne sont pas mentionnées.

EICHORN (21), éprouve des cobayes injectés vingt-quatre heures auparavant avec 2 centimètres cubes de sérum par 1/4 de centimètre cube de culture atténuée, en bouillon de

vingt-quatre heures, dose capable de tuer le cobaye en trois jours.

BALTEANO (22), en 1922, expérimente sur des lapins et des cobayes. Il utilise un matériel dont la virulence est telle qu'il tue le lapin à la dose de 1 *centimètre cube en injection intradermique* ou par badigeonnage sur la peau rasée. Il emploie des « *émulsions épaisses* » de culture sur gélose, ou bien 0,5 centimètres cubes de culture de charbon en bouillon de 24 heures, injectée sans léser la peau, ou encore 0,3 centimètre cube de culture épaisse sur gélose injectée en divers endroits du corps. L'épreuve est recherchée par un badigeonnage à l'aide d'un coton trempé « *dans une culture en bouillon de bacilles charbonneux* », âgée de vingt-quatre heures.

CRINI (23), en 1923, emploie un vaccin permettant au cobaye immunisé en une seule injection de résister à l'épreuve de 1 centimètre cube de culture en bouillon. L'animal immunisé supporte le mélange de 1 centimètre cube de sérum avec « *une anse de culture virulente* ».

GRATIA (24), en 1924, utilise 0,01 centimètre cube à 0,25 centimètre cube de culture en bouillon âgée de 20 heures d'une souche du type agglutiné qu'il injecte à des lapins pour en étudier l'infection. De même il utilise 0,25 centimètre cube de culture en bouillon âgée de 20 heures d'une souche du type diffus pour inoculer d'autres lapins dans le même but.

BROCQ-ROUSSEU et URBAIN (25), en 1923, utilisent pour leurs réactions d'épreuve, sur des chevaux vaccinés avec 0,25 centimètre cube de premier et deuxième vaccin, « *0,5 centimètre cube de culture virulente* » qui tue le lapin de 2.500 grammes à la dose de 1/10.000 de centimètres cubes en injection intradermique (c'est-à-dire cinq cents doses minima mortelles pour le lapin). Ces mêmes auteurs (26), en 1924, éprouvent la résistance de cobayes cuti-vaccinés avec 1/30 de centimètre cube d'une culture très virulente tuant le lapin à la dose de 1/10.000 de milligramme « *de culture sur gélose de vingt-quatre heures* » et d'autre part avec deux souches du type GRATIA

tuant le cobaye à la dose de 1/10.000 de centimètre cube, employées à la dose de 1/20 et 1/30 de centimètre cube.

RIVALIER (27), emploie pour ses expériences, une souche charbonneuse provenant d'un cas humain, déterminant la mort du cobaye, de 400 grammes, à la dose de 1/1000 de centimètre cube d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures, inoculée sous la peau. Des cultures variables sont utilisées : 1/8 de centimètre cube de culture de charbon datant de trois jours ; 1/20 de centimètre cube de culture de charbon en bouillon de vingt-quatre heures, etc., etc.

G. CORDIER (28) dans ses essais de cuti-vaccination contre la fièvre charbonneuse, utilise pour ses inoculations d'épreuve sur les cobayes, une culture en bouillon tuant en vingt-neuf heures le témoin, soumis à une friction de cinq minutes ; ou encore 0,1 centimètre cube d'une culture virulente tuant le cobaye en trente-deux heures par voie intradermique, en vingt-six heures par voie sous-cutanée.

Rossi (29) enfin, cherchant à contrôler l'immunité conférée au cobaye par le premier vaccin, éprouve ces animaux par inoculation « de virus charbonneux », tuant le cobaye à la dose de 1/100.000 de centimètre cube, et le lapin à la dose de 1/10.000 de centimètre cube.

3° Inoculations expérimentales faites au moyen des 1^{er} et 2^e vaccins pasteurisés.

Lorsque les expérimentateurs se sont adressés pour les expériences sur la vaccination contre le *Charbon bactérien* à des animaux très réceptifs, très sensibles, comme le cobaye et le lapin, les inoculations ont été faites avec des vaccins pasteurisés. Ces expériences conservent, nous allons le voir, le même caractère d'imprécision et de vague que celles que nous avons déjà envisagées.

HRUSKA (30), emploie pour ses réactions d'épreuve le deuxiè-

me vaccin charbonneux par friction et injection à la dose de 1/4 de centimètre cube.

URBAIN et ROSSI (31) emploient 1/20 de centimètre cube de deuxième vaccin pour éprouver des cobayes vaccinés avec 1 centimètre cube de liquide d'œdème charbonneux.

BALTEANO (32), dans ses essais de cuti-immunisation charbonneuse chez le cobaye et reprenant par là les expériences de BESREDKA, utilise comme matériel infectant les premier et deuxième vaccins pasteurien injectés dans la peau.

BROCQ-ROUSSEU et URBAIN (33), en 1923, inoculent au cheval par la voie cutanée en vue d'essais de vaccination d'abord, 0,25 centimètre cube de premier vaccin, puis dans les jours qui suivent 0,25 centimètre cube de deuxième vaccin.

STAUB et FORGEOT (34), en 1921, vérifient par l'épreuve au deuxième vaccin la valeur vis-à-vis du cobaye, d'un sérum anticharbonneux préparé à l'aide de bactériidies asporogènes assez virulentes pour tuer un lapin à la dose de 1/10.000 de milligramme.

BOQUET (35) provoque la mort du cobaye après application de trois ou quatre jours de X gouttes de solution Loke « pour une culture sur gélose de deuxième vaccin », émulsion épaisse appliquée sur la région plantaire. Le même résultat est obtenu avec 1/10 de centimètre cube de deuxième vaccin liquide. Il détermine la mort de la souris par inoculation à l'extrémité caudale avec 0,1 centimètre cube de deuxième vaccin dilué au 1/10, soit 1.000 doses minima mortelles.

Ce même auteur (36), étudiant l'infection charbonneuse du cobaye inocule ses animaux sous la muqueuse linguale « avec 1/500 centimètre cube de culture en bouillon de veau de deuxième vaccin » soit 500 doses mortelles.

BROCQ-ROUSSEU et URBAIN (37) inoculent au cheval par voie cutanée (intradermique) dans le but de lui conférer l'immunité anticharbonneuse les premier et deuxième vaccins à doses très variables : 1/20, 1/4, 1/8, 1/4, 1 centimètre cube.

Ces mêmes auteurs (38) vaccinent par la peau des cobayes,

avec 0,05, 0,2 centimètre cube de premier vaccin par voie intradermique ; 0,1, 0,25, 0,5 centimètre cube de deuxième vaccin pour vérifier leur réceptivité pulmonaire.

CORDIER (39) vaccine des cobayes par application sur la peau du ventre rasée, de premier et deuxième vaccin à douze jours d'intervalle ; vaccination par intradermo-injection de premier et deuxième vaccin à la dose de 0,1 centimètre cube. Des moutons sont vaccinés dans les mêmes conditions par friction à l'aide des premier et deuxième vaccins.

ROSSI (40), en 1926, vaccine le cobaye par diverses voies à l'aide du premier vaccin seul avec les doses de 1/8 de centimètre cube dans la peau, 1/8, 1/5, 1/4 centimètres cubes par voie sous-cutanée. L'épreuve est recherchée avec 1/20 de centimètre cube de deuxième vaccin pour les cobayes vaccinés sous la peau et 1/5 de centimètre cube de même produit pour les cobayes vaccinés dans la peau.

FORGEOT (41), en 1927, injecte sept chèvres dans le derme de la queue avec 1/8 de centimètre cube de deuxième vaccin. Le matériel d'épreuve n'est pas mentionné.

COMBIESCO (42), inocule par voie endoveineuse au lapin « 1 centimètre cube de premier vaccin pasteurien sporulé et animalisé » (culture de vingt-quatre heures sur gélose du premier vaccin sporulé émulsionné dans 5 centimètres cubes de sérum physiologique) puis 1 centimètre cube de deuxième vaccin.

Enfin, en 1928, SCHOEFFER (43) introduit dans le péritoine de dix-huit cobayes 0,3 centimètre cube de deuxième vaccin pour démontrer la possibilité de l'infection charbonneuse du cobaye par voie péritonéale. Deux animaux résistent qui sont inoculés en des temps ultérieurs, avec plusieurs doses mortelles de deuxième vaccin.

4° Inoculations faites à l'aide d'un matériel nullement précisé.

Nous en arrivons maintenant à un dernier groupe d'expériences dont les premières sont incontestablement d'une valeur toute relative par suite de leur imprécision typique et dans leurs données et dans leurs résultats, et dont les dernières que nous avons réservées à la fin de ce chapitre, démontrent que la question d'une « virulence » stable et déterminée d'un matériel d'inoculation ou d'épreuve est une chose essentielle, indispensable à l'exactitude rigoureuse des résultats consécutifs.

A. — Dans les expériences que nous allons envisager, il n'est jamais question en aucun moment, au sujet du matériel employé, ni de doses, ni de cultures bien définies. Nous pouvons voir en effet que SOBERNHEIM (44), vaccine des chevaux avec 5 centimètres cubes de sérum et « 0,25 à 0,5 centimètres cubes de culture de charbon » ; pour les moutons il injecte 4 centimètres cubes de sérum et « à peu près la même quantité de virus ».

CARINI (45), immunise des ânes contre le charbon « par des inoculations d'abord sous-cutanées, ensuite intraveineuses » de *bactéridies atténuées* puis « de cultures virulentes en quantités progressivement croissantes ».

DONNA (46) essaie d'immuniser des cobayes et des lapins par injection sous-cutanée « de deux anses d'une culture exposée à la lumière solaire pendant huit heures ». Les lapins survivants « aux doses de 1/5 à 1/10 d'anse de bacilles exposés au soleil pendant quatre heures et se montrent réfractaires à une inoculation ultérieure faite « soit avec des *bactéridies atténuées au soleil*, soit avec des *bactéridies virulentes* ».

DAWSON (47) vaccine le mouton avec une bactéridie renforcée par passages chez de jeunes animaux (lapins). Après douze jours les moutons vaccinés résistent « à l'inoculation virulente ».

HUTIRA et MANNINGER (48) inoculent « avec du charbon virulent (1/1000 à 1/10000 d'anse) » pour éprouver des lapins immunisés avec du sérum normal d'une part et anticharbonneux d'autre part.

NEVODOFF (49), en 1925, éprouve avec « 0,2 centimètre cube de virus charbonneux », des poulains vaccinés par 0,4 centimètres cubes de premier vaccin. Il éprouve d'autres chevaux vaccinés avec « 1,5, 3, et 1,5 centimètres cubes de virus ».

SOÏTUZ (50) éprouve des chevaux vaccinés avec un matériel sans origine précise, avec « 0,50 à 0,70 centimètre cube d'une culture virulente de charbon, culture qui tue le lapin de 1.000 grammes à raison de 1/1000 centimètres cubes », par badigeonnage sur une large surface de peau rasée et scarifiée.

LÉON MULLER (51) inocule deux cobayes avec « 1/100 d'une culture sur gélose de bacilles charbonneux (culture de virulence moyenne ayant tué trois cobayes et repiquée une dizaine de fois depuis). La même souche est injectée à la souris à la dose de « cinq divisions d'une seringue de Barthélemy d'une émulsion qui, comme opalescence, correspond à un vaccin staphylococcique, à 250 millions de germes par centimètre cube ».

L. STERN et N. KOLPIKOW (52) infectent des lapins par injection sous-cutanée « d'une culture virulente de bacilles charbonneux ».

ROVIDA et SCHWARTZ (58) éprouvent des cobayes ayant reçu quinze jours avant, par voie sous-cutanée ou intradermique, du filtrat de culture de charbon âgée de 6, 7 et 9 jours avec « une dose mortelle de culture de charbon ».

On peut se rendre aisément compte par l'examen de ces expériences rapportées avec exactitude, de la diversité des matériels virulents employés et des méthodes selon lesquelles elles ont été conduites. On peut constater les divergences dans leurs résultats d'expériences entreprises souvent dans un même but.

B. — Cette divergence est encore plus marquée et bien plus sensible dans les quelques données expérimentales suivantes :

BESREDKA (54), n 1920, vaccine des cobayes contre le charbon par friction sur la peau rasée, avec du premier vaccin. L'épreuve est faite ensuite à l'aide de deuxième vaccin puis « du virus ». Le cobaye résiste, de même qu'il résiste à l'inoculation intradermique et sous-cutanée des mêmes produits. Ailleurs ce même auteur (55) vaccine le cobaye par la peau en accoutumant celle-ci à « des virus » de plus en plus forts. L'inoculation consécutive de « virus pur » ne provoque qu'une réaction locale légère. Dans ses expériences sur l'immunisation locale, BESREDKA (56) emploie chez le cobayes et le lapin comme matériel vaccinal, du premier vaccin, du deuxième vaccin, du « virus pur » en friction et comme matériel d'épreuve, des cultures mal déterminées : « 1/10 de centimètre cube de culture en bouillon sous la peau, 1, 3, 5 centimètres cubes de virus, 1 centimètre cube de culture sur gélose ». Il éprouve par ailleurs, des cobayes inoculés avec 1 centimètre cube de sérum anticharbonneux, fabriqué à partir d'un cobaye cutivacciné, injecté successivement sous la peau avec « 1 centimètre cube de virus charbonneux, avec 1/4 de centimètre cube de deuxième vaccin sous la peau et 1/100 de centimètre cube de virus ». Enfin, dans le même ouvrage, au sujet du rôle prépondérant de la peau dans l'infection charbonneuse, l'auteur écrit (57) :

« Notons seulement que des doses « de virus plus de cent « fois mortelles » injectées dans la trachée, le péritoine, l'intestin, le cerveau et ailleurs peuvent être supportées sans incommoder visiblement l'animal. »

Nous reviendrons sur ces expériences au chapitre suivant.

En 1923, un groupe d'auteurs, BACHMANN, BELTRAMI, de ROMAT (58) inoculent deux lapins de 1.200 grammes par voie endo-veineuse avec « 0,5 centimètre cube de culture de vingt-quatre heures de bactériidies charbonneuses (échantillon Tablada) ». Ils obtiennent la mort. Ils inoculent deux autres lapins dans les mêmes conditions puis cautérisent le point d'inoculation : la mort est encore obtenue. Ils utilisent pour

la souris « 0,5 centimètre cube de culture de vingt-quatre heures de charbon virulent » poussée dans le derme de l'extrémité caudale et sectionnent immédiatement après cet organe. Les souris meurent.

COMBIESCO (59) inocule des lapins avec 0,1 centimètre cube, 0,5, 1, 2 centimètres cubes, d'une émulsion en sérum physiologique « d'une culture sur gélose âgée de vingt-quatre heures ». Il obtient la mort.

J. BASSET (60) infecte des cobayes avec une culture en bouillon de trois jours « qui inoculée à travers les léguments sous la peau de la cuisse à la dose de 1/120 de centimètre cube tue le cobaye de 600 grammes en deux jours et demi ». Il obtient la mort avec 2 centimètres cubes de cette culture. Il injecte avec cette souche et à doses variables plusieurs cobayes et lapins en deux voies : intracutanée, intramusculaire.

Ailleurs (61), il emploie un virus isolé du mouton excessivement sporogène. Ce virus est employé sous forme de « spores émulsionnées dans de l'eau physiologique et inoculé par diverses voies, par friction cutanée, par voies intradermique, sous-cutanée, intra-musculaire, intrapéritonéale aux doses variables : 1/4, 1/8, 1/16, 1/120, 1/60, 1/2 de centimètre cube. Dans la plupart des cas où la dose est la plus forte, l'auteur obtient la mort.

BASSET arrive à cette conclusion « que les spores pures sont moins pathogènes que les bactériidies. Nous reviendrons sur ce point, dont les chapitres suivants en seront le développement complet.

Nous n'avons voulu démontrer ici que les opinions diverses des différents expérimentateurs sur la virulence de la bactériodie charbonneuse, sur la préparation variée du matériel virulent toujours différent, imprécis et souvent à peine indiqué. Nous avons voulu en faire ressortir les techniques diverses et variables, entraînant fatalement des résultats différents pour des expériences entreprises dans le même but. Les pages précédentes en font foi.

CHAPITRE II

CHOIX D'UN MATERIEL VIRULENT STABLE ET TECHNIQUE DE PREPARATION

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les divers expérimentateurs qui ont eu à se servir de matériel charbonneux virulent, n'ont jamais défini d'une façon *précise* et *absolue*, ce qu'était ce matériel : qu'il s'agisse de sang, d'organes d'animaux morts ou malades, voire même de cultures. Ils ne se sont pas soucié d'utiliser un matériel dont le degré de virulence ait été contrôlé d'une façon exacte. La diversité des méthodes, du matériel, du lieu d'inoculation, peut être la conséquence, selon les expérimentateurs, de divergences plus ou moins marquées dans les résultats, du point de vue du temps et des manifestations morbides. Examinées de plus près, certaines expériences du chapitre précédent sont marquées par cette variété dans le but final.

Pour ne citer qu'un seul de ces contrastes frappants et typiques à la fois, envisageons d'une part les expériences de BESREDKA et de divers autres auteurs qui ont admis ses hypothèses, et d'autre part les expériences identiques, entreprises dans le même but, par BACHMAN, BELTRAMI, de ROMAT. Sans envisager de nouveau les techniques nous nous bornons à rappeler ici le sujet du contraste.

BESREDKA affirme que les injections virulentes charbonneuses, intraveineuses, intracardiaques, et par toute autre voie que la peau, ne sont pas suivies de l'évolution du charbon bactérien ; tandis que par ailleurs BELTRAMI, BACHMAN et ROMAT obtiennent l'infection charbonneuse au moyen d'inoculations

de cultures, par diverses voies autres que la peau. Il semble bien que cette divergence d'opinion entre deux groupes d'expériences conduites avec la même méthode avec les mêmes précautions pour ne pas léser la peau, est due à n'en pas douter à une *différence de virulence* du matériel employé par les uns et les autres. En outre, faut-il considérer la seule lésion cutanée comme le critérium de l'infection charbonneuse ou au contraire admettre que le rôle de la peau n'est pas exclusif dans l'infection par *bacillus anthracis* et que l'infection par le charbon est possible sans lésion cutanée? Il paraît que cette longue polémique n'ait encore oint reçu de solution bien qu'il soit permis de penser, qu'il n'y a pas d'injection sous-cutanée ou sous-muqueuse sans lésion de la peau.

D'après les conclusions de ces derniers auteurs vis-à-vis des travaux de BESREDKA (62) :

« De ces expériences on peut conclure que les lapins et les souris peuvent être infectés par voie veineuse ou sous-cutanée sans infection de la peau. Ces résultats sont si différents de ceux de BESREDKA et de ses collaborateurs que nous supposons qu'ils dépendent des souches diverses de bacilles employées. »

D'après RIVALIER (63), en outre, qui semble lui-même affirmer la légitimité de leurs expériences :

« Il est donc légitime d'admettre que les insuccès enregistrés par BESREDKA et d'autres bactériologistes dans l'inoculation charbonneuse tiennent à un faible degré de virulence de la culture qu'ils ont utilisée. »

Il apparaît nettement que cette variété dans les résultats obtenus est directement rattachée à la grande question de la *virulence*, qui nous occupe et qui, seule, fait tout l'intérêt de ce problème, qu'elle domine. Il est probable que si ces expériences avaient été entreprises avec des « matériels » comparables entre eux, bien déterminés, précis, l'opinion serait moins partagée. En effet, il ne faut pas oublier que (64) :

« L'on peut, par divers procédés d'atténuation ou de culture, créer des variétés nouvelles de bactériidies dont la virulence est parfois modifiée suivant un mode particulier... Les faits montrent que chaque espèce animale possède une réceptivité particulière pour les diverses races que l'on peut créer par la culture. *Ils montrent aussi avec quelles conditions de relativité doivent être entendues les expressions de « réceptivité » et de virulence. »*

Et tout ce qu'il y a de vague quand on parle d'un animal qui a résisté à l'inoculation « *d'une culture virulente, d'une culture de vingt-quatre heures, de trente-six heures, de 1/100.000 d'anse, 1/10.000 de cultures sur gélose* », cultures qui ne sont pas assez précisées, pouvant être constituées de spores ou de mycélium.

I. — Des causes diverses de la variabilité de la virulence suivant le matériel employé.

Ces méthodes envisagées semblent et sont, à notre avis, toutes plus ou moins défectueuses du point de vue qui nous occupe.

a) En effet la virulence d'une injection de sang charbonneux ou de filtrat d'organes, calculée comparativement aux réactions organiques manifestées, ne semblent pas être une donnée absolue mais *strictement relative*, car le sang prélevé sur un animal malade peut être plus ou moins riche en microbes selon le moment de l'évolution de la maladie naturelle ou expérimentale. Il faut en outre à ce sujet tenir compte de l'*individualité* qui peut prêter au germe un développement plus ou moins complet et rapide : de la taille, de la réceptivité, du point d'inoculation, tous facteurs qui font que la bactériémie est plus ou moins massive. Par ailleurs, le sang employé, bien que virulent, peut contenir des bacilles impossibles à déceler au microscope, seulement décelables en culture appropriée.

b) De même comme nous l'avons vu, la virulence, malgré un chiffre approximativement exact, est-elle bien définie du fait d'une *opalescence comparée*. Le germe est contenu, dans le bouillon de culture et ce germe n'est constitué que de bactériidies, le bacille ne sporulant pas en bouillon. Or ce bouillon peut renfermer des cadavres et des bacilles vivants et l'opacité manifeste, d'une façon normale, la totalité des germes, le pourcentage brut des germes *morts* et *vivants*. Il découle de cela que probablement la virulence de deux émulsions de cultures de même opalescence sera différente selon que le nombre des germes vivants sera plus considérable dans l'une ou l'autre.

c) Pour le contrôle strict d'un matériel du point de vue de sa virulence, nous devons tenir compte du nombre de germes inoculés. La technique ci-dessus ne le permet pas et encore bien moins celle qui est basée sur l'emploi d'émulsions d'organes charbonneux. On comprend difficilement en effet ce que peut représenter du point de vue de la virulence l'extrait de 1/5 de rate charbonneuse prélevée chez le cobaye. Lorsqu'on fait des prélèvements de ce genre, chaque matériel varie du point de vue pathogène, variation qui peut tenir au poids de l'organe, à son volume par conséquent, facteur essentiellement variable d'un sujet à l'autre ; à la quantité de produit injecté pour déterminer l'infection chez l'animal donneur, dans le cas particulier : le deuxième vaccin.

Dans un même poids de deux rates il peut y avoir des quantités variables de bactériidies suivant la rapidité de la marche de l'infection et la nature du processus de multiplication du germe chez chacun des deux sujets, suivant les réactions organiques propres à chaque individu et enfin selon le moment du prélèvement, moment situé dans le temps de l'évolution morbide.

II. — Variation de l'évolution des germes avec le milieu.

Nous l'avons vu, au cours du chapitre précédent, beaucoup d'auteurs emploient des milieux de culture variables, ce qui est susceptible de provoquer des différences parfois appréciables dans l'évolution du même germe suivant le milieu. L'action pathogène par conséquent subit inévitablement les mêmes fluctuations. En outre dans ce que nous avons pu voir, aucun auteur ne spécifie les caractéristiques exactes du milieu utilisé : richesse en peptone, en sels minéraux, la concentration moléculaire, etc. Avec chaque milieu il y a une multiplication plus ou moins importante des germes d'où une virulence variable et ceci se manifeste par la variété des doses de cultures employées dans les expériences diverses. C'est tantôt « 1 centimètre cube d'une émulsion de culture fraîche sur gélose » ; par ailleurs il s'agit de « 5 centimètres cubes de culture de trente-six heures en bouillon, 0,5 centimètre cube de l'émulsion de culture de huit heures sur gélose, 1/4 de centimètre cube de culture atténuée en bouillon de vingt-quatre heures, etc. »

Bien que de pratique courante dans les laboratoires, ces techniques semblent insuffisantes et surtout peu précises pour que l'on puisse sans restriction, s'en tenir aux manifestations qu'elles provoquent.

Des expériences simples nous ont démontré que selon le milieu et la durée de la culture, le nombre des germes microbiens varie. A cet effet nous avons établi divers milieux, à savoir :

- 1° Du bouillon de viande ordinaire, peptoné à 20 p. 1000.
- 2° Du bouillon de viande ordinaire, peptoné à 10 p. 1000.
- 3° Du bouillon Kub du commerce.
- 4° Du bouillon Liebig du commerce.

Ces deux derniers milieux ont été préparés suivant la tech-

nique simple qu'en donne le Manuel de microbiologie et sérologie de CALMETTE, BOQUET et NÈGRE (65). Sans nous étendre sur ses particularités, nous nous bornerons à indiquer que ces produits sont susceptibles d'être employés avec les mêmes chances de bons résultats et avec commodité dans les pays où on ne peut avoir des viandes de veau aptes à produire un bouillon de culture bien favorable.

Ces milieux ont été répartis en tubes identiques de mêmes dimensions à raison de 10 centimètres cubes par tube. Ces bouillons,ensemencés à partir d'une culture charbonneuse sur gélose sont placés à 37° pendant vingt-quatre heures. Après ce délai nous avons procédé sur chacun des milieux à une numération de germes.

1° METHODE DE NUMERATION DES GERMES

Parmi toutes les méthodes de numération qui s'offraient à nous, méthodes de WRIGHT, de SALIMBENI, méthode de dilution successive avec ensemencement en boîtes de PETRI, plus ou moins précise et délicate, nous avons choisi celle de WRIGHT (66), comme étant à notre sens plus commode ; elle est basée sur la comparaison du nombre des microbes et des hématies sur un frottis desséché. C'est un rapport qu'il faut établir. Cette méthode consiste à mélanger un centimètre cube d'émulsion vaccinale (ici du bouillon de culture) colorée par une goutte de bleu de méthylène en solution aqueuse à 1/100, avec un égal volume de sang humain (dont on a déterminé au préalable la richesse en globules rouges) et avec 3 centimètres cubes d'eau salée physiologique. On prélève une goutte de ce mélange qu'on étale sur une lame porte-objet et qu'on laisse sécher. Les microbes apparaissent en bleu parmi les hématies. Dans plusieurs champs du microscope on compte d'une part les hématies et d'autre part les éléments microbiens. Il ne reste plus qu'à établir le rapport des uns aux autres pour déterminer le nombre de microbes contenus dans

1 centimètre cube de cultures en bouillon et cela par la formule suivante :

$$\frac{H}{B} = \frac{\text{Nombre de globules au cc.}}{X}$$

X représentant le nombre de bacilles contenus dans 1 centimètre cube de bouillon.

Nous nous sommes largement inspiré de cette méthode, mais surtout dans son principe après en avoir légèrement modifié la technique à la suite d'essais infructueux. Ne parvenant pas à obtenir une visibilité suffisante pour compter les hématies soit par vice de préparation, soit par mauvais étalement, nous avons eu recours à un artifice de coloration consistant dans l'emploi d'encre de chine, dans le but d'obtenir une coloration négative. Cette méthode due à ERRERA (1884) et puis à BURRI (1909) (66 bis) est utilisée ordinairement pour la coloration des capsules et fut appliquée au diagnostic du charbon bactérien par DJOUBELIEFF.

Nous avons donc établi les mélanges cités selon la technique de WRIGHT : 1 centimètre cube de bouillon de culture, 3 centimètres cubes d'eau physiologique, 1 centimètre cube de sang de cheval plus facilement à notre disposition et d'une manipulation plus aisée que le sang de chien ou le sang humain. Ce sang était citraté à 10 % à partir d'une solution de citrate de soude à 3 %.

Nous avons prélevé une goutte de mélange et nous l'avons déposée sur une lame porte-objet. Puis après y avoir déposé également une goutte d'encre de chine, nous avons effectué sur la lame même le mélange des deux gouttes et procédé à un étalement régulier. La préparation est séchée rapidement sur la lampe et montée. On examine sans lamelle dans une goutte d'huile de cèdre, avec un objectif à immersion homogène. De cette manière dans chaque champ du microscope, sur un fond noir ou marron, en nappes, dû à l'encre de chine, les globules

rouges se détachent avec une remarquable netteté en blanc. Les *bactéridies charbonneuses* apparaissent également en blanc, disséminées parmi les globules, isolées ou sous forme de chaînettes, dont les éléments sont parfaitement perceptibles et numérables, de même que les globules. Le tout est d'un effet très démonstratif. C'est la technique que nous avons employée pour toutes nos numérations avec un succès toujours identique.

Nous avons admis comme teneur en globules, normale et moyenne, du sang de cheval, le nombre de « 7.400.000 hématies » au centimètre cube.

Chacun de nos milieux eut sa teneur en germes contrôlée de cette façon.

a) Pour le bouillon de viande ordinaire peptoné à 20 p. 1000 nous avons obtenu :

Pour le premier champ :

$$\frac{\text{Hématies} \quad 125 = 57 \times 7.400.000}{\text{Bactéridies} \quad 57 \quad \quad 125} \quad X = 3.374.400.000 \text{ germes au cc.}$$

Pour le deuxième champ :

$$\frac{\text{Hématies} \quad 138 = 60 \times 7.400.000}{\text{Bactéridies} \quad 60 \quad \quad 138} \quad X = 3.217.391.304 \text{ germes au cc.}$$

Pour le troisième champ :

$$\frac{\text{Hématies} \quad 86 = 32 \times 7.400.000}{\text{Bactéridies} \quad 32 \quad \quad 32} = 2.753.488.372.$$

D'autres champs examinés nous ont donné des chiffres sensiblement rapprochés.

b) En ce qui concerne le bouillon de viande ordinaire peptoné à 10 p. 1000 et suivant la même technique que nous ne répéterons plus, nous avons eu les teneurs en germes suivantes :

$$1^{\text{er}} \text{ Champs} \text{ --- } \frac{H}{B} = \frac{160}{45} = 2.081.250.000 \text{ germes au cc.}$$

$$2^{\text{o}} \text{ Champs} \text{ --- } \frac{H}{B} = \frac{215}{60} = 2.065.116.279 \text{ germes au cc.}$$

$$3^{\text{o}} \text{ Champs} \text{ --- } \frac{H}{B} = \frac{150}{50} = 2.446.666.666 \text{ germes au cc.}$$

c) *Le bouillon Liebig* nous a donné une culture abondante et nous avons pu remarquer que dans ce milieu, les bactériidies étaient beaucoup plus ténues, moins épaisses dans leurs proportions que celles examinées dans le bouillon ordinaire.

La numération nous a donné :

$$1^{\text{er}} \text{ Champs} = 2.622.222.222 \text{ germes au centimètre cube.}$$

$$2^{\text{o}} \text{ Champs} = 2.220.000.000 \text{ germes au centimètre cube.}$$

$$3^{\text{o}} \text{ Champs} = 2.065.714.285 \text{ germes au centimètre cube.}$$

d) *Pour le bouillon Kub* les numérations ont donné les chiffres suivants :

$$1^{\text{er}} \text{ Champs} = 2.775.000.000 \text{ de germes au cc.}$$

$$2^{\text{o}} \text{ Champs} = 2.233.333.333 \text{ de germes au cc.}$$

$$3^{\text{o}} \text{ Champs} = 2.335.294.117 \text{ de germes au cc.}$$

Sans doute nous objectera-t-on que la méthode en elle-même ne présente pas toutes les garanties de précision désirables, mais nous n'avons pas eu pour but dans ces recherches d'obtenir des chiffres absolus, mais des chiffres relatifs, des rapports entre les propriétés de culture des différents bouillons employés, et il nous semble que les chiffres obtenus établissent ce rapport d'une façon assez nette du moins après vingt-quatre heures de culture.

Nous avons poursuivi nos numérations en les faisant porter sur un seul milieu, le bouillon Liebig, et toujours par la même méthode.

Après quarante-huit heures de maintien à l'étuve à 37° la numération pour ce milieu nous a donné :

$$\text{Pour un 1}^{\text{er}} \text{ Champs } \frac{H}{B} = \frac{210}{80} X = 2.819.047.619 \text{ germes au cc.}$$

$$\text{Pour un 2}^{\text{e}} \text{ Champs } \frac{H}{B} = \frac{87}{54} X = 4.593.103.148 \text{ germes au cc.}$$

$$\text{Pour un 3}^{\text{e}} \text{ Champs } \frac{H}{B} = \frac{95}{60} X = 4.673.684.210 \text{ germes au cc.}$$

Enfin, après 72 heures les numérations qui ont été effectuées toujours sur le même milieu nous ont donné les résultats suivants :

$$\text{1}^{\text{er}} \text{ Champs } \frac{H}{B} = \frac{38}{45} = 8.763.157.895 \text{ germes au cc.}$$

$$\text{2}^{\text{e}} \text{ Champs } \frac{H}{B} = \frac{108}{75} = 5.138.888.888 \text{ germes au cc.}$$

$$\text{3}^{\text{e}} \text{ Champs } \frac{H}{B} = \frac{102}{70} = 5.078.431.372 \text{ germes au cc.}$$

Nous avons examiné d'autres champs pour lesquels nous avons obtenu jusqu'à 10 milliards de germes au centimètre cube.

Quoiqu'il en soit, ces dernières numérations après quarante-huit et soixante-douze heures nous donnent, on le constate, pour un même bouillon, une teneur variable en bactériidies par unité de volume, teneur supérieure à celle établie sur le même élément après vingt-quatre heures de culture à 37°.

Ces expériences peuvent servir à démontrer que suivant le milieu et le temps de culture, la multiplication de la bactériidie est variable au sein du milieu considéré : il y a une influence

apportée par le milieu à laquelle s'ajoute la propriété intrinsèque du germe tendant plus ou moins à une multiplication active. Elles montrent encore la précision toute relative qu'ont certaines expériences où l'on emploie 5 centimètres cubes de culture de 24 heures en bouillon, etc., etc.

2° ACTION DU MODE D'ENSEMENCEMENT

Certains auteurs ont employé dans leurs expériences des émulsions de cultures sur gélose déterminées en ces termes « 1/100, 1/000 de tube de gélose ; 1 centimètre cube d'émulsion de culture de vingt-quatre heures sur gélose, etc., etc. » Or il convient de faire remarquer ici qu'il y a des souches qui cultivent d'une façon variable, soit en mycélium impossible à dissocier, soit en thalle dissocié. Dans ces conditions le même volume de dilution de l'une et l'autre culture ne provoque pas les mêmes effets pathogènes. En outre en dehors de ces propriétés propres aux souches, il faut envisager le mode d'ensemencement qui, selon la façon dont il sera effectué, et quelle que soit la souche fera varier le nombre des germes poussés, dans des proportions assez larges.

C'est ainsi que tout comme pour les milieux liquides, les expériences utilisant des cultures sur milieux solides que nous avons relatés au chapitre I, ne présentent pas du point de vue de la virulence une garantie certaine et absolue mais strictement relative. Les expériences suivantes le démontrent.

A. Un premier groupe d'expériences a été entrepris avec des tubes de même diamètre. Ces tubes de 15 centimètres de longueur, de 15 millimètres de diamètre, contenant une même quantité de gélose au bouillon ordinaire ont été *ensemencés* avec le même fil de platine, avec la même quantité de culture sur gélose de vingt-quatre heures d'une même souche, au même moment, mais de façon différente :

a) Un premier groupe a été *ensemencé en stries courtes rectilignes* de 5 ou 6 centimètres de longueur ;

b) Un deuxième groupe a étéensemencé en *stries longues rectilignes* de 12 centimètres de longueur ;

c) Un troisième groupe a étéensemencé en ondulations larges ;

d) Un dernier groupe a étéensemencé en ondulations très rapprochées.

Ces divers groupes ont été placés à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures. Après ce temps nous avons procédé à une numération, non pas en comptant les germes, mais par mesure de l'opalescence des émulsions, basées sur la technique classique (67).

Pour établir la variabilité du nombre des germes suivant la nature de l'ensemencement, nous avons récolté pour chaque groupe de tubes les colonies existant après vingt-quatre heures. Ces récoltes ont été placées en tubes rigoureusement identiques et nous avons ramené le contenu de chaque tube à un même volume, soit 10 centimètres cubes. Nous nous sommes trouvé en présence de quatre émulsions, l'une représentant le produit de cultures poussées en stries rectilignes courtes, l'autre le produit des stries rectilignes longues, la troisième le produit d'ondulations larges, une dernière le produit de la récolte des colonies poussées en ondulations très rapprochées.

Ces quatre émulsions ont été l'objet de dilutions. Celles-ci ont été pratiquées dans des tubes de même nature que ceux contenant les émulsions primitives, en portant successivement à l'aide de pipettes graduées 1 centimètre cube d'émulsion obtenue dans 9 centimètres cubes de sérum physiologique stérile.

Nous avons dilué l'émulsion provenant de stries rectilignes courtes jusqu'au taux de 1/100 (10^{-2}). A ce taux nous avons obtenu une émulsion assez claire pour pouvoir être comparée visiblement à d'autres émulsions par des examens faits à contre-jour. C'est cette émulsion que nous avons employée comme dilution-test, nous conformant en ce point de vue à la technique envisagée ci-dessus.

Puis, par des dilutions successives et appropriées nous avons voulu ramener au même degré d'opalescence que celle de l'émulsion-test, les émulsions obtenues à partir de divers autres ensemencements.

Nous avons vu que pour arriver à ce résultat, il nous a fallu pousser nos dilutions à des degrés différents suivant l'émulsion, produit de tel ou tel ensemencement.

C'est ainsi que pour l'émulsion obtenue à partir de stries rectilignes longues il nous a fallu pousser nos dilutions jusqu'au taux de 10^{-2} . A ce taux l'opalescence obtenue se montrant supérieure à celle du test, nous avons dilué au taux de 10^{-3} . A ce nouveau taux l'opalescence était moindre que celle du test. Nous admettons donc que le taux réel de dilution permettant d'obtenir une opalescence égale à celle de l'émulsion-test, se limite entre les taux de 10^{-2} et 10^{-3} . Nous ne recherchons ici que des rapports relatifs et non des résultats absolus ; aussi est-ce la raison pour laquelle nous n'avons pas dans ce cas particulier, déterminé un taux rigoureusement exact.

Les émulsions des cultures en stries ondulées larges ont dû être diluées jusqu'au taux de 10^{-4} , auquel nous avons obtenu une émulsion dont l'opalescence s'est montrée égale en tous points à celle de notre test.

Enfin la même technique exercée sur l'émulsion primitive obtenue à partir d'ondulations très rapprochées, nous a permis d'obtenir une émulsion comparable quant à son opalescence, à celle de l'émulsion-test considérée ci-dessus, au taux de 10^{-6} .

Ces expériences nous permettent de démontrer que pour obtenir la même opacité, il faut pousser beaucoup plus loin les dilutions de l'émulsion obtenue avec une strie rectiligne longue comparativement à celles effectuées à partir de stries courtes et beaucoup plus loin encore celles pratiquées sur l'émulsion primitive établie à l'aide des cultures provenant d'ensemencements en stries ondulées larges et en stries ondulées très rapprochées. Le nombre de germes y est très sensiblement différent. Nous avons pu observer après trois jours

au fond des tubes contenant nos émulsions primitives une sédimentation des germes.

La hauteur de sédimentation mesurée du dehors, au niveau de la ligne de séparation du liquide émulsionnant et des germes sédimentés d'une part, d'autre part au niveau de l'extrémité inférieure du tube, était variable suivant l'origine de l'émulsion et dans les proportions suivantes :

Emulsions de cultures en stries rectiligne courte = 18 millimètres.

Emulsion de cultures en strie rectiligne longue = 23 millimètres.

Emulsion de cultures en ondulations larges = 29 millimètres.

Emulsion de cultures en ondulations rapprochées = 35 millimètres.

B. Nous avons expérimenté dans le même sens avec des tubes de longueur et de diamètre différents ensemencés en stries longues uniquement, et nous avons abouti aux mêmes conclusions générales. Suivant le diamètre du tube et suivant sa longueur la récolte des germes donne des émulsions variables quant à leur opalescence, et comme dans les expériences ci-dessus, les dilutions doivent être d'autant plus poursuivies que l'émulsion est obtenue de cultures en tubes de plus en plus grands dans leurs proportions.

Nous pouvons donc conclure, que du point de vue de la virulence stricte, et dans l'expérimentation, un matériel n'est que très relativement défini quant au nombre des germes et à sa nature lorsqu'on en parle en disant « 1/100 de tube de gélose, 0,5 centimètre cube de l'émulsion d'une culture de huit heures sur gélose, etc., etc. »

Enfin poursuivant la critique des expériences de notre premier chapitre et plus particulièrement de celles pour lesquelles on a employé des « cultures virulentes » du « virus » nous ferons remarquer que suivant la souche elle-même, l'abon-

dance de la culture est essentiellement variable et la richesse en germes de deux émulsions de cultures de deux souches différentes peut varier souvent dans une large mesure. Et l'on peut ajouter cette notion classique : à savoir que suivant le milieu il y a une influence manifeste sur la virulence elle-même et celle-ci, dans une culture, varie selon que l'on s'adresse à une culture n'ayant pas fait de passages et obtenue directement d'une animal mort de charbon ou à une culture ayant fait des passages en nombre variable, soit sur gélose, soit sur des animaux.

De tout ceci il résulte que dans les expériences faites en vue de l'étude de la virulence de *bacillus anthracis* aucune n'est susceptible, entreprise dans les mêmes conditions matérielles, et considérant la méthode employée et les variétés constatées surtout dans les éléments virulents utilisés, voire même dans les résultats obtenus, de donner des conclusions constantes, comparables entre elles, entre les mains d'expérimentateurs divers. *Ce sont pour la plupart des techniques qui ne valent que pour un opérateur : leur auteur ;* et pour pallier à cet inconvénient, il y aurait lieu d'envisager pour l'étude de la virulence de *bacillus anthracis*, l'emploi d'une méthode d'inoculation unique, uniforme, « *standardisée* » pour ainsi dire, méthode qui, utilisée par tout expérimentateur, permette d'obtenir avec une dose donnée, d'une dilution virulente bien déterminée, la mort d'un animal d'espèce déterminée, en un temps donné, méthode enfin qui corresponde avec notre définition de la virulence citée au début de ce travail et qui en constituerait le cadre pratique.

I. — Choix d'un matériel et stabilité des émulsions sporulées.

Cette nécessité d'employer avec une méthode unique un « matériel stable » et bien défini semble avoir été presentie par un auteur, BASSET (68), qui remarque dans son travail

« qu'avec le virus charbonneux, si l'on excepte les expériences d'ingestion, des essais analogues ne furent pas tentés (emploi des spores pures), que les auteurs parlent indifféremment de bactéridies ou de spores. »

et il ajoute :

« Par rapport au virus mixte, les spores pures sont d'un maniement plus commode et plus facile. *Elles représentent un matériel dont l'action peut être exactement mesurée et susceptible de se conserver longtemps égal à lui-même. Elles permettent sans doute d'obtenir des vaccins de valeur pratique supérieure à celle du virus mixte...* »

La méthode dont nous envisageons l'emploi tient toute dans ces lignes tant au point de vue de sa technique qu'au point de vue de sa valeur pratique et de ses conséquences utiles. C'est celle qui consiste dans l'emploi de spores charbonneuses pures comme matériel virulent d'inoculation. Toute la fin de notre travail aura pour but de démontrer l'utilisation dans tous ses détails des spores pures de la bactéridie de DAVAINÉ.

AVANTAGE DU MATERIEL SPORULE

Ces avantages sont multiples et connus depuis fort longtemps. Avant tout les spores constituent un matériel stable, se conservant égal à lui-même. La stabilité de cette forme biologique spéciale du germe virulent, à l'endroit de son pouvoir pathogène doit être admis sans restriction, des expériences précises en faisant foi.

En effet l'on sait et il est admis définitivement depuis PASTEUR que les spores charbonneuses conservent très longtemps leur virulence dans la terre.

A. VON SZEKLY s'est assuré par desensemencements et des inoculations que des spores charbonneuses étaient encore vivantes après douze années passées au laboratoire.

SIRENA a conservé des spores charbonneuses dans de la terre stérile à l'abri de l'humidité pendant seize ans.

Busson a observé que des spores desséchées sur des fils de soie depuis dix-sept ans ont donné naissance à une culture d'une virulence extrême.

Au point de vue pratique on a essayé d'obtenir des spores pour la conservation du matériel destiné au diagnostic : c'est la *méthode strasbourgeoise* de MARXER, PFERSDORFF et JACOBSTHAL, qui ont démontré qu'en étalant en couche mince du sang charbonneux même putréfié sur des baguettes de plâtre imbibées de bouillon on obtient des spores beaucoup plus rapidement qu'en bouillon ou sur gélose.

Il y a donc sans contestation possible un rapport de nécessité évident entre l'état sporulé et la conservation, qui sont deux éléments intimement liés.

BOZELLI a indiqué un moyen de fortune qui peut trouver son application dans divers pays. Il enduit l'une des faces d'une tige de fêrue séchée, fendue en deux, de matériel virulent de telle sorte que l'absorption soit complète. On affronte les deux moitiés et on ligature le tout.

Enfin l'on sait que dans le sang desséché les spores constituées peuvent résister longtemps : c'est un des mécanismes de l'infection naturelle.

Cependant ces méthodes valables pour le but pratique dans lequel elles ont été envisagées, n'ont plus qu'un intérêt... historique, en ce qui concerne le point de vue particulier qui nous intéresse. En effet, quand pour des besoins divers on dessèche du matériel virulent, des spores lavées, et à plus forte raison des spores constituées dans un liquide albumineux, il se forme des croûtes qui, semblables en cela à la caséine desséchée, ne peuvent être pulvérisées et si on les manipule dans ce sens on n'obtient que des particules de volumes différents donnant des émulsions hétérogènes difficilement titrables.

D'où la nécessité *absolue* d'un point de vue pratique plus commode de rechercher une méthode de production et de conservation de spores charbonneuses en un milieu liquide capa-

ble de donner par dilution une suspension homogène. Cependant contrairement aux propriétés de *B. chauvœi* qui peut, on le sait, sporuler au sein même de l'organisme infecté, la bactériodie charbonneuse en est totalement incapable. D'autre part si la bactériodie se multiplie à l'extrême dans les milieux liquides à température convenable, elle n'y sporule pas ou du moins très peu. Force nous sera donc de nous adresser au mode de culture sur milieux solides en vue d'obtenir une sporulation parfaite et de constituer par la suite les émulsions liquides nécessaires.

Cette idée d'employer des cultures stables sous forme de spores dans les inoculations expérimentales ou autres et qui semblent innovée par BASSET, n'est cependant pas extrêmement récente et nous avons pu constater que dès 1884, CIENKOWSKY à Karkow, s'efforçait de produire un vaccin sporulé utilisé depuis lors en Russie avec plus ou moins de succès. DETRE en Hongrie, NITTA au Japon, emploient également un vaccin sporulé. Plus tard, EICHORN aux Etats-Unis, THEILER et ses collaborateurs au Cap, VELU au Maroc, CORDIER enfin, préparent et utilisent dans un but vaccinal des émulsions sporulées.

Nous avons recherché la technique de préparation employée par ces divers auteurs. Il est nécessaire d'en envisager quelques-unes afin de pouvoir éclairer la suite de ce travail.

CIENKOWSKY (69) obtenait ses spores par la culture en bouillon de bactériodies atténuées, culture poussée jusqu'à ce qu'il obtienne une grande abondance de germes sporulés. Le bouillon de culture était mélangé à deux parties de glycérine.

DETRE (70) se servait d'un vaccin préparé en lavant la surface de culture sur gélose avec une solution de sérum physiologique glycérimé.

EICHORN (71), dans un travail sur la vaccination contre le charbon bactérien, définit une méthode d'obtention des spores charbonneuses en vue de la préparation d'un vaccin. Il emploie à cet effet un milieu solide : de la gélose au bouillon

sans peptone, un milieu pauvre, qu'il cultive à 37°5 pendant quatre à sept jours, temps qui permet aux spores de se former en grande abondance. La culture est ensuite lavée et récoltée dans un flacon stérile et chauffée à 60° pendant une demi-heure pour détruire les formes végétatives mycéliennes susceptibles d'exister encore dans la culture sporulée. Puis on prélève une quantité précise et mesurée de cette suspension et l'on détermine le nombre de spores contenues dans 1 centimètre cube. On peut diluer cette suspension pour l'amener à des taux convenables à envisager pour les inoculations qu'on se propose de faire. EICHORN emploie pour la vaccination du bœuf et du cheval 1.000.000 de spores contenues en 1 centimètre cube. La préparation sporulée est préalablement titrée par inoculation de 250.000 spores environ à des animaux déterminés, cobayes et lapins. En raison des facilités de conservation des spores des lots importants de vaccin peuvent être préparés ainsi sans crainte d'altération.

C'est là la méthode d'EICHORN si judicieusement comprise, et il est étonnant que cet auteur n'ait pas également précisé la préparation d'émulsions titrées, non plus vaccinales mais virulentes, puisque nous l'avons vu dans le chapitre précédent utiliser le sang du cobaye mort de charbon « avec la souche la plus virulente ».

CORDIER essaie de préciser l'emploi d'une culture sporulée pour fixer les maxima des doses mortelles de cultures charbonneuses de différents âges. Ce n'est là qu'un essai sans grosse valeur pratique. Nous ne l'envisagerons pas dans le détail. Il en est tout autrement de la technique que nous allons envisager maintenant : celle de THEILER.

THEILER (73) apporte encore beaucoup plus de précisions qu'EICHORN sur l'obtention des spores pures et sur le contrôle de la valeur virulente de ce matériel obtenu.

« Cette technique est une vieille méthode de préparation de vaccins sporulés (employés pendant de longues années, particulièrement en Russie). Ces années dernières elle fut très largement utilisée en

Australie, au Japon et en Amérique du Nord. En France, nous n'avons pas connaissance de son emploi. Malgré une certaine prévention qui, pendant longtemps, a existé contre l'emploi de tels vaccins en raison des risques supposés résultant de l'introduction des spores virulentes dans l'organisme, cette méthode, par sa précision, a prévalu. On pourrait prétendre, les spores germant dès leur introduction dans l'organisme, qu'il n'existerait aucune différence sensible entre les émulsions sporulées et les émulsions bacillaires. Il y a cependant une différence appréciable du point de vue de son intérêt pratique, qui fait toute la valeur de son emploi : c'est qu'avec les émulsions de spores, le nombre des germes vivants émulsionnés reste constant pendant de longs mois. »

Tout ceci résume clairement les avantages multiples de l'emploi de spores pures comme matériel virulent.

D'un point de vue purement matériel et technique, la méthode de THEILER est également intéressante. Pour obtenir le maximum de sporulation les cultures doivent être largement aérées et dans ce but on les établit dans des flacons de Fernback. Dans ces flacons on verse une mince épaisseur de gélose nutritive de $\text{pH} = 7,5$. On stérilise et on laisse à l'étuve pendant deux ou trois jours pour s'assurer de la stérilité primitive et pour assurer aussi complètement que possible l'évaporation d'un excès d'humidité. Ces flacons sont alorsensemencés avec une très petite quantité de culture juste suffisante pour mouiller la surface du milieu, opération faite dans une flamme pour éviter les chances de contamination possible. Les fiolesensemencées sont maintenues à $35-37^{\circ}$ pendant un temps variable avec la rapidité et l'importance de la sporulation : cette période est déterminée par des examens quotidiens. Dès que la sporulation atteint 80 à 90 pour cent des germes récoltés sur un frottis, les flacons sont retirés de l'étuve et placés à la température du laboratoire où on les laisse une semaine pour permettre aux spores d'atteindre leur complet développement. La récolte a lieu ensuite dans les conditions ordinaires en respectant l'asepsie du milieu. L'émulsion originale est ensuite traitée par le sérum physiologique glyciné, ajouté après à raison de deux parties de glycérine pour une

d'émulsion, en poids. L'emploi de la glycérine a pour but de détruire d'une façon rigoureuse et complète les germes et microorganismes non sporulés qui peuvent se rencontrer malgré tout dans l'émulsion primitive. Son rôle exact et les principes de son emploi seront déterminés ci-après.

Par dilutions appropriées de ce matériel, on parvient à faire tenir la dose minima mortelle dans 1 centimètre cube, très facilement. Pour titrer son vaccin, THEILER s'est servi de 1.000 doses minima mortelles pour le mouton. C'est-à-dire qu'il estime qu'un animal se trouve suffisamment protégé contre l'infection naturelle dans les conditions les plus variées, lorsqu'il a reçu un vaccin qui le protège contre 1.000 D.M.M.

C'est ainsi que THEILER parvient à déterminer un matériel fixe et immuable quelles que soient les circonstances. Par sa simplicité, sa clarté, sa valeur pratique et bactériologique, cette méthode nous a conquis et c'est à elle que nous nous adressons pour obtenir un matériel virulent immuable susceptible d'une conservation prolongée, nécessaire à notre étude de la virulence de *bacillus anthracis*.

Cependant cette technique serait d'un intérêt pratique plus considérable encore si THEILER avait envisagé et précisé bien des points de détail que nous allons étudier dans les paragraphes qui vont suivre, où nous essaierons de les déterminer rigoureusement.

II. — *Obtention de cultures sporulées.*

Choix d'un milieu.

Nous proposant d'obtenir des spores, nous avons bien entendu largement emprunté à la technique de THEILER en précisant certains détails.

Ce n'est pas là une étude complète de la sporulation que nous avons entreprise. En effet, si ce mode de multiplication spécial à certains anaérobies, sous l'influence du milieu exté-

rieur semble connu dans les phases successives de son mécanisme intime, en ce qui concerne certains germes et particulièrement *bacillus anthracis*, bien des points restent encore obscurs au sujet de la « sporogénèse » vraie et de la germination principalement en ce qui concerne le milieu extérieur. (74) « On a beaucoup discuté sur les causes de la sporogénèse et cependant toutes les conditions intérieures et extérieures qui la déterminent ne sont pas connues ».

Nous n'envisagerons pas pour *bacillus anthracis* l'examen de ces conditions intérieures qui constituent à elles seules un sujet suffisant pour un travail spécial. Seules les conditions extérieures nous intéressent ici et doivent prendre place dans cette étude.

1° CHOIX D'UN MILIEU

Il convient de déterminer un milieu de culture propre à l'obtention de matériel sporulé stable, précis, déterminé, donnant des récoltes abondantes avec des exigences moindres.

Nous utiliserons donc des milieux ordinaires divers si tant est que les essais tendant à la constitution de milieux synthétiques ne semblent pas encore bien au point, ni favorables et n'engagent pas à leur utilisation.

Ces milieux différents, de richesse variable, sont placés à des températures variées, ensemencés également avec le même matériel, à la même dose. Ceci nous amènera à choisir comme milieu le plus favorable à la sporulation, celui qui comparativement aux autres, assurera dans un temps moindre, à une température donnée, une plus ample récolte de spores.

Et à cet effet nous avons procédé aux expériences suivantes dont voici succinctement exposé le protocole :

A. *Milieux*. — Pour obtenir des spores pures nous nous sommes adressé, afin d'établir des comparaisons et imitant en cela les expériences de BUCHNER (75) et SCHREIBER (76) à divers milieux et notamment :

- 1° De la gélose au bouillon ordinaire peptoné à 20 p. 1000 ;
- 2° De la gélose au bouillon ordinaire peptoné à 10 p. 1000 ;
- 3° De la gélose au bouillon ordinaire sans peptone ;
- 4° De la gélose au bouillon « Liebig » peptoné à 10 p. 1000, établie suivant une technique précédemment envisagée ;
- 5° De la gélose au bouillon « Kub » ;
- 6° De la gélose à l'eau peptonée à 20 p. 1000.

Nous avons choisi à dessein ces milieux variés afin d'étudier les phénomènes physiques de la sporogénèse encore peu connus jusqu'ici, comme nous l'avons mentionné.

A cet effet, nous avons réparti chacun de ces milieux en boîtes de Roux de 250 centimètres cubes en observant rigoureusement les indications de THEILER, respectant en cela les conditions d'aération. Ces flacons ont été ensuite stérilisés à 120°, puis maintenus à l'étuve et ensemencés après trois jours avec une culture de quarante-huit heures en bouillon ordinaire à 37°. Ces flacons ensemencés aseptiquement ont été divisés en quatre groupes constitués chacun de six milieux différents.

B. *Températures.* — Pour déterminer une température favorable nous avons placé chacun des lots aux températures suivantes :

- 1° Un lot à 37° ;
- 2° Un lot à 30° ;
- 3° Un lot à 22° ;
- 4° Un lot à 10°.

Ces quatre températures nous ont semblé propices à nos expériences ayant été choisies de 10 en 10 degrés dans l'échelle proposée par SCHREIBER.

2°. CONTROLE DE LA SPORULATION

a) *Macroscopiquement.* — Après vingt-quatre heures nous avons entrepris la vérification de la marche de la sporulation pour chacun des lots à une température différente.

Macroscopiquement d'abord, nous avons pu nous rendre compte qu'aux températures de 37°, 20° et 22°, d'abondantes colonies étaient poussées en une couche uniforme sur tous les milieux, mais nous avons pu noter qu'à la température de 22° la culture présentait sur tous les milieux, un retard sensible sur les cultures semblables, placés à 30° et 37°. Quant au lot placé à 10°, aucune colonie ne manifesta sa présence sur aucun milieu. Le milieuensemencé était tel que nous l'avions laissé la veille.

b) *Microscopiquement.* — Nous avons effectué ce contrôle au moyen d'une coloration simple. Après avoir étalé, séché et fixé les prélèvements de nos divers milieux, nous les avons colorés au moyen de fuchsine phéniquée de Ziehl, mise en contact pendant quelques secondes. Nous avons obtenu de cette manière une coloration très nette, puissante et supérieure à celle obtenue par la méthode de Gram que nous avons préalablement essayée. C'est cette méthode que nous avons utilisée toujours dans tous les examens suivants.

Cet examen nous a permis de constater qu'à 22° après vingt-quatre heures de maintien à l'étuve, la sporulation est nulle pour les milieux au bouillon ordinaire peptoné à 20 p. 1.000. Il en est de même pour le milieu au bouillon peptoné à 10 p. 1.000 et pour le milieu à l'eau peptonée. Seuls les milieux au Liebig, ou bouillon ordinaire sans peptone, au bouillon Kub, manifestent une sporulation très peu abondante, mais déjà commençante. Au centre des bâtonnets constitués en chaînettes plus ou moins longues on voit des espaces réfringents en formation. Il n'y a encore pas de sporanges.

A 30°, l'examen des cultures nous révèle une végétation sporulée à son début, plus abondante que celle envisagée sur les mêmes milieux que ci-dessus, avec prédominance marquée dans la production pour les milieux Liebig et au bouillon ordinaire sans peptone.

A 37°, la sporulation est active certes sur tous les milieux

mais d'un taux inférieur néanmoins à celui relevé sur les milieux précédents.

Des examens identiques ont été faits après quarante-huit heures et soixante-douze heures et ces derniers nous ont permis de constater que sur les milieux au Liebig et au bouillon ordinaire sans peptone, placés à la température de 30°, le taux de la sporulation était très élevé, voisin approximativement de 80 à 90 %, alors que sur tous les autres milieux aux différentes températures envisagées, la sporulation était active mais moins évoluée.

Sur ces milieux précités, nous avons vérifié par la coloration spécifique des spores, de MOELLER (77), si le taux était réellement celui établi. Par cette méthode qu'il est nécessaire de modifier en certains points (insister davantage sur les temps de coloration et le chauffage) nous avons pu voir que des cultures provenant des milieux au bouillon Liebig ou au bouillon sans peptone, placés à 30°, présentaient des spores en quantité considérable. Plusieurs champs ne contenaient que des spores isolées sans aucun sporange persistant, sous forme de petits points rouges et réfringents. Dans quelques champs à peine quelques bâtonnets subsistaient, colorés en bleu et disséminés.

Nous concluerons donc de ces premières expériences qu'il existe, pour nous, une température optima pour la production de spores en grande abondance : celle à 30° ; qu'il semble y avoir deux milieux électifs, les plus favorables à une récolte sporulée abondante, pour cette température : la gélose en bouillon ordinaire sans peptone et la gélose en bouillon Liebig peptoné à 10 p. 1.000 ; que pour ces milieux il suffit d'un séjour de soixante-douze heures à l'étuve à 30° pour avoir des spores en quantité suffisante. Nous nous arrêterons dans notre choix d'un milieu sporogène, à la gélose au bouillon Liebig, car ce bouillon ainsi obtenu a l'avantage sur le bouillon ordinaire d'être un produit « moyen » soumis à des variations de constitution les plus minimes.

3° VARIATIONS DE LA TENEUR EN PEPTONE DANS LE MILIEU CHOISI

Nous avons voulu donner de notre milieu choisi une composition exacte et définitive, stable et contrôlée dans ses aptitudes sporogènes. Aussi, après avoir déterminé la température optima, les conditoin's générales d'oxygénation (emploi de boîtes de Roux de 250 centimètres cubes), nous avons essayé de déterminer le taux optimum de matière nutritive, la peptone ordinaire, nécessaire à une sporulation active. A cet effet nous avons préparé de la gélose au bouillon Liebig peptoné à des taux variables :

- 1° Gélose au *bouillon Liebig* sans peptone ;
- 2° Gélose au *bouillon Liebig* peptoné à 5 p. 1.000 ;
- 3° Gélose au *bouillon Liebig* peptoné à 10 p. 1.000 ;
- 4° Gélose au *bouillon Liebig* peptoné à 15 p. 1.000 ;
- 5° Gélose au *bouillon Liebig* peptoné à 20 p. 1.000 ;
- 6° Gélose au *bouillon Liebig* peptoné à 30 p. 1.000.

Ces milieux répartis en boîtes de Roux, ensemencés selon la technique envisagée ci-dessus, ont été placés à 30° et des examens microscopiques ont été pratiqués après vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures après coloration par la méthode de Gram et, plus simplement, à la fuchsine phéniquée.

Nous n'envisagerons pas dans le détail les particularités constatées et relevées minutieusement pour chacun des milieux utilisés, après chaque temps, au sujet de la marche de la sporulation. Nous concluerons seulement très succinctement au sujet des résultats recueillis après soixante-douze heures.

Après soixante-douze heures, et d'une façon générale, la sporulation sur tous les milieux est très active mais inégale en quantité sur chacun d'eux. Il est permis de constater un avantage très net au point de vue sporogène du milieu au bouillon Liebig sans peptone sur les autres milieux plus riches. Sur ce milieu la sporulation peut être considérée comme com-

plète ou plutôt elle atteint facilement le taux de 80 à 90 % préconisé par THEILER. Très peu de bactériidies sont intactes. Il n'y a plus aucune chaîne nettement constituée comme nous l'avons constaté après vingt-quatre heures par exemple, et les rares bactériidies isolées qui existent sont en voie de sporulation, à l'état de sporanges. Par ailleurs, les spores y sont en grand nombre, agglomérées dans certains champs, ou disséminés en amas, ou isolées, nettement constituées.

Sur les autres milieux la sporulation est avancée certes, mais elle n'atteint pas le taux envisagé et ne pourrait satisfaire au but proposé : obtenir des spores en grande quantité avec le moins possible de bactériidies subsistantes, après un temps moindre.

Nous concluerons donc à l'utilisation pour l'obtention d'un matériel sporulé de *gélose au bouillon Liebig sans peptone* qui semble plus apte à fournir une culture sporulée très riche en éléments.

4° VARIATION DE LA RICHESSE EN EXTRAIT LIEBIG

Dans un même ordre d'idée nous avons constitué des milieux variables au point de vue du *taux* en extrait Liebig. Nous avons établi dans ce but, divers lots de gélose, préparée à partir de bouillons dosés différemment en extrait :

1° Gélose à l'eau alcalinisée et salée selon les conditions ordinaires de fabrication du bouillon.

2° Gélose au bouillon Liebig à 5 p. 1.000 d'extrait ;

3° Gélose au bouillon Liebig à 10 p. 1.000 d'extrait ;

4° Gélose au bouillon Liebig à 15 p. 1.000 d'extrait ;

5° Gélose au bouillon Liebig à 20 p. 1.000 d'extrait.

Poursuivant nos expériences sur le même type nous avons contrôlé la sporulation sur ces milieux successivement après vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures, au moyen du microscope et après coloration.

Après vingt-quatre heures sur le milieu *sans extrait*, nous

avons pu nous rendre compte macroscopiquement que la culture montre une très faible épaisseur sur toute la surface solide et apparait fortement granuleuse et brune. Elle ne manifeste pas l'espace enchevêtré et blanc des autres cultures. Le microscope révèle aisément de nombreux bâtonnets absolument intacts ; mais par contre il est facile de voir de nombreuses bactériidies comportant vers leur milieu des espaces réfringents, arrondis ou ovalaires suivant la longueur plus ou moins grande de la bactériдие et constituant la spore en formation. Ce serait là une preuve en faveur de l'hypothèse émise depuis fort longtemps et bien connue qui considère en général la pauvreté nutritive du milieu de culture comme un facteur indispensable à une sporulation abondante.

Nos expériences précédentes nous ont démontré — et nous avons insisté à ce sujet que le milieu riche donnait aussi des spores mais en moins grande abondance. Le milieu pauvre est peut-être plus fertile à ce point de vue ; néanmoins il faut considérer à cet endroit une pauvreté toute relative.

En effet, sur le milieu à 3 p. 1.000 d'extrait après vingt-quatre heures, nos examens nous ont permis d'y déceler une culture sporulée très avancée, supérieure en quantité d'éléments à celle envisagée ci-dessus, et ceci permet bien de constater que, si pour une sporulation rapide et abondante il faut entretenir la bactériдие charbonneuse sur un milieu pauvre, ce caractère du milieu ne doit cependant pas être absolu.

Enfin sur les milieux très riches en extrait de 10 p. 1.000 à 20 p. 1.000, l'allure générale de la sporulation est identique après vingt-quatre heures. Le mycélium est excessivement abondant et la sporulation très minime surtout sur le milieu à 20 p. 1.000.

Après soixante-douze heures, les examens successifs nous prouvent qu'au point de vue de la teneur en extrait Liebig le taux le plus favorable à une sporulation avantageuse à peu près complète et s'opérant assez rapidement, atteint approximativement de 2 à 5 p. 1.000. Sur les milieux aux taux très élevés

en extrait, on distingue de longs filaments mycéliens à peu près intacts et quelques bactériidies en voie de sporulation. La culture en elle-même est active mais très incomplète.

En résumé, le taux d'extrait qui nous semble le plus propice pour établir un milieu sporogène favorable est celui de 5 p. 1.000 que nous choisirons ; c'est un milieu pauvre par rapport aux autres milieux utilisés mais d'une pauvreté relative.

5° VARIATION DE LA CONCENTRATION MOLECULAIRE AU SEIN DU MILIEU CHOISI

Le taux normal et optimum de sel à ajouter à un bouillon de culture ordinaire est de 7 gr. 5 à 8 grammes par litre. En ce qui concerne le bouillon Liebig, la technique de préparation donne le taux de 5 p. 1.000 comme normal pour le bouillon de culture. Nous avons fait varier dans divers milieux le taux de la concentration moléculaire dans les proportions de 1 à 30 p. 1.000, afin d'obtenir un taux optimum nécessaire à la culture sporogène.

Cependant chacune des variations a été établie par ajout de quantités variables de sel pour former le taux voulu après avoir au préalable dosé et contrôlé la concentration en sel de l'extrait Liebig, tel qu'il est livré par le commerce.

Les taux divers ont été constitués en tenant compte de cette concentration initiale, afin d'utiliser des données aussi rigoureuses que possible.

Nous avons préparé un bouillon Liebig au taux de 5 p. 1.000 d'extrait, sans peptone, et après les manipulations nécessaires nous avons contrôlé sa teneur en sel à l'aide de la méthode suivante utilisant les réactifs ci-après :

1° Solution d'azotate d'argent à 17 p. 1.000.

2° Solution de chromate de potasse à 10 %.

A. Technique.

a) La solution d'azotate d'argent est placée dans une longue

pipette graduée à support et munie à son extrémité d'un ajustage réglable à volonté ;

b) Dans une fiole ou un verre on mélange : 5 centimètres cubes du bouillon à contrôler, 20 centimètres cubes d'eau distillée, X à XV gouttes de la solution de $\text{Cr O}^3\text{K}$.

c) On ajoute le nitrate d'argent peu à peu avec beaucoup de précaution en ayant soin de faire disparaître par l'agitation le précipité rongéâtre qui se forme, et ceci jusqu'à l'obtention d'un précipité de couleur rose chair uniforme et stable.

Par cette méthode le taux de NaCl d'une solution est donné par litre en multipliant le nombre de centimètres cubes de solution d'azotate d'argent utilisés par 1,17 qui est une constante.

C'est ainsi que nous avons pu voir que le bouillon préparé avec l'Extrait Liebig à notre disposition, utilisé au taux de 5 p. 1.000, avait une teneur en sel égale à 0 gr. 90 par litre. C'est à partir de cette teneur que les milieux aux divers taux ont été établis.

B. Milieux utilisés.

1° Gélose à 0,90 p. 1.000 de NaCl ;

2° Gélose à 5 p. 1.000 de NaCl ;

3° Gélose à 10 p. 1.000 de NaCl ;

4° Gélose à 15 p. 1.000 de NaCl ;

5° Gélose à 20 p. 1.000 de NaCl ;

6° Gélose à 25 p. 1.000 de NaCl ;

7° Gélose à 30 p. 1.000 de NaCl .

Ces milieux ainsi préparés, et en nous plaçant toujours dans les mêmes conditions générales que lors des expériences précédentes, nous avons procédé au contrôle de la marche de la sporulation.

Après vingt-quatre heures l'allure générale de la sporulation est identique sur tous les milieux avec cependant une prédominance sensible pour le milieu à 10 p. 1.000 de NaCl qui semble plus favorable. Partout ailleurs les spores, en constitution dans les filaments nombreux, sont peu développées.

Après quarante-huit heures et soixante-douze heures, macroscopiquement les cultures poussées sur les milieux de 10 à 20 p. 1.000 de NaCl, semblent chétives et plus brunes par rapport à celles poussées sur les autres milieux. Microscopiquement, la sporulation est très avancée après quarante-huit heures et presque totale après soixante-douze heures sur les milieux de 10 à 20 p. 1.000 de NaCl. Il y a dans les divers champs examinés beaucoup de spores isolées, ou groupées, constituées par une coque ronde, colorée en rouge par le Gram négatif, limitant un espace clair réfringent. Partout ailleurs la sporulation est nettement inférieure quantitativement et les bactériidies intactes restent nombreuses.

En résumé, après soixante-douze heures de maintien à 30°, la sporulation est croissante en quantité du taux de 0,92 p. 1.000 de NaCl au taux de 20 p. 1.000. Entre 10 et 20 p. 1.000 de NaCl la sporulation sur ces milieux semble passer par un maximum qui pourrait être 15 p. 1.000, taux choisi par nous comme étant le plus favorable aux conditions optima de la sporogénèse. Il faut noter cependant que par rapport aux taux de 10 et 20 p. 1.000, le milieu à 15 p. 1.000 de NaCl, n'est qu'à peine manifestement le meilleur et l'on pourrait indifféremment choisir l'un de ces trois taux sans changer les résultats recherchés.

Autre détail, celui-ci d'ordre pratique.

Nous avons pu remarquer au cours de ces expériences, que d'une façon générale la sporulation était d'autant plus avancée et complète que l'on pouvait plus facilement constituer sur la lame porte-objet et dans la goutte de sérum physiologique nécessaire à l'étalement, une émulsion parfaitement homogène. Après vingt-quatre heures, les étalements sont difficilement homogènes et le prélèvement reste agglutiné en petites masses filamenteuses ; tandis qu'après soixante-douze heures à l'étuve et huit jours de maintien à la température du laboratoire, le prélèvement fait sur les milieux s'émulsionne avec facilité sur la lame et d'une façon homogène. Ce pourrait être

à la rigueur une mesure de la sporulation, mesure peu précise certes, et moyen de fortune plutôt valable pour le seul bacille charbonneux.

6° VARIATION DE LA CONCENTRATION IONIQUE DANS LE MILIEU CHOISI

Nous avons préparé dans ce but un milieu au bouillon Liebig sans peptone salé au taux de 15 p. 1.000 alcalinisé à la soude de façon ordinaire et divisé en six lots d'une quantité égale, soit 200 centimètres cubes pour chaque lot.

A. *Technique.* — Le pH a été calculé pour chaque lot par la méthode colorimétrique à l'aide de l'appareil de Bruère dont les échelles colorées donnent le pH correspondant aux colorations obtenues avec les indicateurs suivants :

Bleu de Bromothymol = pH 6 à 7,6 ;

Rouge de Méthyle = pH 4,4 à 6 ;

Rose de Phénol = 6,8 à 5,4.

Nous avons prélevé un échantillon sur la quantité entière de notre bouillon alcalinisé par la soude de façon à se rapprocher le plus possible de la neutralité (pH 7).

On établit une solution de soude à 1/200 ou 1/300 ainsi qu'une solution d'acide chlorhydrique au même taux. La comparaison entre la couleur du tube étalon et celle du tube de bouillon dont on calcule le pH se faisant dans une petite éprouvette graduée établie à cet effet, de 2 centimètres cubes, on calcule le nombre de gouttes de la solution alcaline ou acide que l'on doit ajouter à 2 centimètres cubes du premier bouillon pour obtenir le pH acide ou alcalin. Exemple : 1 goutte de solution de soude est nécessaire à 2 centimètres cubes de bouillon pour obtenir à partir de ce bouillon primitif un pH de 7,4. Dix gouttes seront nécessaires pour 20 centimètres cubes de bouillon et 100 gouttes pour 200 centimètres cubes pour obtenir le même pH.

C'est par cette méthode que nous avons établi sur chacun de nos six lots de bouillon un pH différent.

L'échantillon de 2 centimètres cubes prélevé sur la masse totale de bouillon a nécessité une goutte de solution alcaline pour avoir le pH 7,4. Cent gouttes ont donné le même pH aux 200 centimètres cubes que nous avons utilisés.

B. *Milieux*. — Par des ajouts de soude et d'acide et par comparaison aux étalons colorés, nous avons obtenu les six milieux suivants :

- 1° Bouillon Liebig de pH = 5.
- 2° Bouillon Liebig de pH = 6.
- 3° Bouillon Liebig de pH = 7.
- 4° Bouillon Liebig de pH = 7,4.
- 5° Bouillon Liebig de pH = 7,6.
- 6° Bouillon Liebig de pH = 8.

De cette façon, la précision obtenue, étant assez grande, nous a paru suffisante.

Cependant il nous faut signaler que nous n'avons pas tenu compte dans l'établissement des divers pH du léger facteur acide apporté par la suite, par la gélose ajoutée au taux de 30 p. 1.000 au bouillon, pour constituer les milieux solides nécessaires à notre expérimentation.

Ces milieux ensemencés selon la technique et placés à 30° ont subi des examens successifs comme précédemment.

De ces examens nous avons pu mettre en évidence que le pH le plus favorable pour une bonne sporulation semble être d'après nos recherches un pH variant dans des limites restreintes entre 7 et 7,6 ; le pH optimum pouvant être considéré comme celui de 7,4. A ce pH la sporulation est plus abondante qu'aux autres, mais d'après ce que nous avons pu voir, ce pH n'est qu'un optimum relatif. En effet le degré d'alcalinité ou d'acidité dans les limites de 5 à 8 *ne semble pas* un facteur très considérable et bien important à envisager, *susceptible* d'influencer dans un sens ou dans l'autre la sporulation de la bactériodie charbonneuse. Le milieu de pH 5 donne des spores en quantité à peine moindre. Le milieu de pH 8 en donne éga-

lement. Néanmoins nous fixerons le pH 7,4 comme étant la réaction capable de nous donner la meilleure sporulation.

CONCLUSIONS. — Par ces expériences nous avons établi un milieu fixe qui, réalisé dans les conditions décrites, devra nous donner notre matériel virulent sporulé.

Ce milieu est de la gélose au bouillon Liebig *sans peptone*, dont la teneur en extrait sera de 3 à 5 p. 1.000, la teneur en NaCl de 15 p. 1.000, la concentration ionique de pH = 7,4.

Ce milieu ensemencé suivant la technique de THEILER maintenu à la température de 30° pendant 72 heures nous assurera d'une production sporulée à peu près complète et pure, facilement stérilisable si elle ne l'est pas, par les moyens que nous allons indiquer.

III. — Stérilisation des spores obtenues. *Destruction des germes non sporulés.*

Après avoir placé le milieu choisi sur lequel les spores se manifestent en quantité, à la température du laboratoire dans un placard, pendant huit jours, pour assurer une sporulation parfaite, on opère à l'aide de billes de verre et de sérum physiologique la récolte des spores, et ceci de façon aseptique, en ayant soin de contrôler le poids de sérum physiologique utilisé. Ces spores constituées en émulsions, outre le mycélium encore imparfaitement sporulé qu'elles sont susceptibles de contenir, peuvent encore renfermer certains germes vivants non sporulés dont la présence peut être due à une manipulation pas toujours rigoureusement aseptique. Ces contamination peuvent être dues à des souillures de l'air qu'il importe de détruire pour obtenir un matériel jouissant de caractères primordiaux à avoir : virulence, pureté, stabilité.

Dans le but d'assurer une pureté parfaite à nos spores émulsionnées et de façon à stériliser notre émulsion de tout germe

asporulé étranger au charbon, nous avons entrepris une longue série d'expériences comparables à celles que SEIFFERT (78) entreprit en son temps pour vérifier l'action bactéricide de la glycérine sur divers germes et notamment B. Coli, Pyocyanique staphylocoque, streptocoque, subtilis, B. de la dyphtérie, B. de la Dysenterie, charbon bactérien, etc. SEIFFERT utilisa un milieu au blanc d'œuf glycérimé. Nous avons expérimenté avec du *sérum physiologique glycérimé à raison de deux parties de glycérine pour une partie de sérum en poids*.

1° DESTRUCTION DES GERMES ASPORULES AUTRES
QUE LA BACTERIDIE CHARBONNEUSE
ACTION DU SERUM GLYCERINE

Nous avons contrôlé l'action du sérum glycérimé sur divers germes les plus ordinaires, à savoir :

- 1° *Sarcine* ;
- 2° *Pyocyanique* ;
- 3° *Prodigiosus* ;
- 4° *Staphylocoque doré*.

Chacun de ces germes a été émulsionné en tube dans 20 centimètres cubes de sérum physiologique glycérimé stérile. Cette émulsion a été faite pour chaque germe à partir d'une culture fraîche de quarante-huit heures sur gélose. Pour la commodité de l'expérience nos émulsions ont été réparties en deux lots :

a) Un premier lot de tubes ne contenant que les germes-souillures purs et établi par addition de 1 centimètre cube d'émulsion épaisse à 20 centimètres cubes de sérum glycérimé et ceci pour chaque germe.

b) Un deuxième lot de tubes contenant une émulsion identique (1 centimètre cube d'émulsion épaisse dans 20 centimètres cubes de sérum glycérimé) à laquelle nous avons ajouté dans chaque tube 2/10 de centimètres cubes d'émulsion de spores charbonneuses.

Les tubes du premier et du deuxième lot sont placés à sept

températures différentes et dans des conditions différentes afin de pouvoir déterminer exactement le temps et les conditions de destruction de chaque germe par le sérum glyciné :

(1 de chaque lot et par germe)

- 2 tubes à 37° ;
- 2 tubes à 30° à l'obscurité ;
- 2 tubes à 30° à la lumière ;
- 2 tubes à 24° à l'obscurité ;
- 2 tubes à 24° à la lumière ;
- 2 tubes à la glacière à 10° ;
- 2 tubes à la glacière à 0°.

En outre, nous avons établi des émulsions témoins de chaque germe, émulsions faites dans du sérum physiologique pur sans glycérine. Chacun des tubes témoins a été placé dans les mêmes conditions que les germes correspondants en sérum physiologique glyciné.

Afin de noter l'ordre de disparition des germes dans le temps et aux diverses températures, nous avons fait desensemencements abondants, sur gélose, à partir des émulsions de souillures, de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures, sans exercer aucun contrôle sur l'émulsion spores charbonneuses-souillures.

Expérience type. — Nous avons pu voir ainsi que, pour le *staphylocoque doré*, par exemple, ce germe n'est plus vivant après un séjour de trois jours en sérum glyciné à 37°. Un ensemencement copieux sur gélose nous a permis de le constater. A ce moment nous avons voulu nous rendre compte si le germe étudié avait également disparu de l'émulsion souillures-spores, placée à 37° pendant le même temps. La culture nous a permis de constater que le staphylocoque avait disparu également dans cette émulsion, tandis que les spores étaient restées vivantes et poussaient encore avec vigueur.

Enfin, nous avons contrôlé, après avoir constaté le temps de

PYOCYANIQUE II

1	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
2			+		+		+		+		+++		+++	
3	—				+		+		+		+++		+++	
4			—	+			+		+		+++		+++	
5					—	+					+++		+++	
6							—	+	—	+	+++		+++	
7														
8											++		+++	
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18											+		++	
19														
20														
21														

que nous envisagerons ci-après, tous les germes envisagés par nous, disparaissent à cette température de trois à cinq jours. L'ordre de disparition des mêmes germes aux différentes températures est donné par les tableaux ci-contre. Nous avons voulu déterminer simplement une température susceptible de débarrasser rapidement nos spores des germes asporulés. Celle de 37° est optima. C'est celle que nous choisirons pour la stérilisation de nos spores. Faisons remarquer néanmoins qu'aux basses températures les germes résistent longtemps à l'action du sérum glyciné et que leur résistance est à peine plus longue à la température de 30° à la lumière qu'à 37°. Donc en envisageant les seuls résultats obtenus à la température de 37°, nous avons pu constater que :

Le *staphylocoque doré* était détruit après trois jours ; que le *pyocyanique* l'était après trois jours également ; la *sarcine* n'a disparu qu'après quatre jours ; le *prodigiosus* n'était plus vivant après trois jours.

De ces expériences nous pouvons faire remarque que tout

MYCELIIUM ASPOROGENE V

1	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
4	++		÷		+	+	+	+	+	+	+++		+++	
8	--+		+		+	+	+		+		+++		+++	
15			+		+		+		+		+++		+++	
17	—	+			+		+		+		+++		+++	
20			—	÷			—	+			+++		+++	
25					—	+					+	+	÷+	+

comme dans celles de SEIFFERT, la disparition des germes mis en sérum physiologique glycérimé, s'est effectuée le plus rapidement à la température la plus élevée, soit 37°, et leur survie est d'autant plus longue que la température est plus basse. L'allure générale des expériences de SEIFFERT le démontre. Les nôtres, même avec un milieu sensiblement différent, ne les contredisent pas.

SEIFFERT avait fait la preuve du rôle bactéricide de la glycérine sur les germes asporulés. Cependant, pour ce qui est du charbon, il ne semble pas avoir fait la différence entre le charbon mycélien et le charbon sporulé. Or il est intéressant pour nous de savoir quel est le temps relatif que met le mycélium charbonneux pour disparaître et être tué par le sérum physiologique glycérimé.

2° DESTRUCTION DE LA BACTERIDIE ASPOROGENE
PAR LE SERUM GLYCERINE

Il est capital en effet de notre point de vue particulier d'avoir pour matériel virulent des spores et seulement des spores. Le mycélium qui pourrait persister, générerait considérablement les opérations de titrage que nous envisagerons ci-après. Si ce titrage des spores virulentes était fait avant la disparition du mycélium, on n'aurait point le même titre après dix ou quinze jours. Le titre baisserait en effet proportionnellement au nombre d'éléments mycéliens tués au fur et à mesure de la conservation.

Nos expériences précédentes ont démontré l'inefficacité totale

du sérum glycérimé sur les spores pures. Nous avons voulu contrôler ce fait dans cette seconde expérience ayant pour but de déterminer le temps nécessaire pour la destruction en sérum glycérimé du mycélium asporogène, condition indispensable pour entreprendre un titrage strict et immuable.

Dans ce but nous avons émulsionné du mycélium charbonneux asporogène (culture de huit heures sur gélose). Puis dans un certain nombre de tubes contenant 20 centimètres cubes de sérum physiologique glycérimé, nous avons dilué 1 centimètre cube de l'émulsion épaisse primitive. En même temps nous avons préparé une émulsion de spores « *pures* » que nous avons répartie en tubes identiques à raison de 1 centimètre cube par tube.

Spores et mycélium ont été placés aux températures envisagées ci-dessus, et de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures nous avons observé la marche de la disparition du mycélium seulement par des ensemencements journaliers d'abord, par examen entre lame et lamelle à sec, au moyen du microscope ensuite.

Nous avons pu de cette manière constater que la température qui donnait la plus rapide disparition du mycélium était 37°, et ceci après un séjour de dix-sept à vingt jours en sérum physiologique glycérimé. Les spores placées dans les mêmes conditions sont restées bien vivantes. L'émulsion témoin de bacilles asporogènes en sérum physiologique seul, ensemencée après ce délai, a produit une culture abondante.

Conclusions. — De ceci nous pouvons conclure que les diverses souillures susceptibles de se rencontrer dans une culture de spores charbonneuses peuvent être aisément anéanties après des temps variables suivant les germes et les températures, par l'action du sérum physiologique glycérimé à raison de deux parties de glycérine pour une de sérum en poids. Que cet élément a un rôle bactéricide plus actif que le milieu employé par SEIFFERT ; que le mycélium charbonneux encore

imparfaitement sporulé susceptible de se trouver associé aux spores récoltées, est stérilisé après un séjour de dix-sept à vingt jours dans le sérum physiologique glyciné à la température de 37°, température optima pour ce mode de stérilisation des germes asporulés. Nous avons donné les raisons pour lesquelles il était nécessaire d'attendre cette disparition du mycélium pour entreprendre un titrage définitif et immuable de notre matériel virulent sporulé. Enfin nous avons démontré que les spores charbonneuses n'ont subi en rien l'action du sérum glyciné, même après vingt jours de séjour à la température bactéricide par excellence. Elles sont restées ce qu'elles étaient : aussi nombreuses et vivantes. Sont-elles virulentes? Les expériences du paragraphe suivant nous le feront savoir.

IV. — Titrage de l'émulsion de spores charbonneuses pures.

L'émulsion sporulée ainsi obtenue et ayant subi les manipulations indiquées au paragraphe précédent, à savoir un séjour de dix-sept à vingt jours en sérum glyciné à 37°, peut désormais être considérée comme pure, c'est-à-dire qu'elle ne contient que des spores vivantes et aucun autre germe.

Afin d'établir sa virulence vis-à-vis d'animaux réceptifs bien déterminés, cette émulsion mère doit subir un titrage précis.

Ce titrage a été envisagé à la fois sur le cobaye et le lapin, par la méthode des dilutions successives, après avoir pris les précautions indiquées par VELU, BALOZET, JALABERT (79), dans une note relative à la technique des dilutions. Ces précautions essentielles consistent à changer de pipette chaque fois que l'on transporte 1 centimètre cube de l'émulsion établie précédemment (dilution au 1/10 par exemple) dans 9 centimètres cubes de sérum physiologique, pour établir le taux de dilution inférieur (le 1/100 par exemple). Ces auteurs ont souligné toute l'importance qu'il y a, à observer minutieusement cette précaution dans des opérations de ce genre :

« Lorsqu'on utilise la même pipette pour toutes ces opérations, on commet des erreurs importantes, parce qu'il y a de nombreux germes adhérents aux parois de la pipette et sont transportés dans des tubes où l'on ne devrait plus en rencontrer un seul... Les germes retenus aux parois des pipettes sont d'autant plus nombreux que le liquide qui les véhicule est plus visqueux. (C'est le cas ici puisque le liquide émulsionnant les spores est constitué pour les deux tiers par de la glycérine.) L'un de nous a constaté qu'en se servant d'émulsions de spores charbonneuses de densité donnée, la dose minima mortelle pour le lapin variait du cinquante millionième au millionième, suivant que la dilution était faite avec une seule pipette ou que l'on changeait de pipette à chaque fois. En changeant de pipette à chaque fois on commet une erreur également, mais c'est une erreur en moins presque insignifiante, puisqu'elle doit être rapportée à une grosse quantité. On transporte dans le tube suivant 900.000 germes par exemple au lieu de 1.000.000, tandis qu'en opérant avec la même pipette on finit par avoir par exemple 50.000 germes quand il ne devrait plus y en avoir du tout. »

1° TITRAGE DU NOMBRE DES GERMES PAR UNITE DE VOLUME

En vertu de ces principes que nous avons rigoureusement observés, nous avons opéré des dilutions successives du taux de 10-1 au taux de 10-7, en changeant de pipette à chaque fois.

Nous avons voulu tout d'abord voir combien de germes pouvait contenir 1 centimètre cube de l'émulsion diluée aux taux les plus bas, soit 10,6 et 10,7.

Dans ce but, trois boîtes de Pétri ont étéensemencées chacune à raison de 1 centimètre cube de la dilution au taux de 10,6. Sur chacune des boîtes nous avons obtenu en moyenne huit à dix colonies correspondant à autant de spores. Nous avons ensuite déterminé le nombre des germes par unité de volume de la dilution au taux de 10-7.

A cet effet, cinq boîtes de Pétri ont étéensemencées à raison de 1 centimètre cube de la dilution par boîte et après quarante-huit heures de maintien à 37° nous avons pu observer les faits suivants :

Deux boîtes étaient stériles ;

Deux boîtes portaient une colonie chacune ;

Une boîte portait deux colonies.

De sorte, que approximativement et en moyenne, 1 centimètre cube de la dilution au taux de 10^{-7} de notre émulsion mère contient une spore. Il est facile de déduire théoriquement le nombre de germes contenus dans les taux de plus en plus élevés. Ce nombre est variable bien entendu pour chaque dilution avec la densité plus ou moins grande de l'émulsion mère obtenue par la récolte aseptique des cultures sporulées. Ainsi pour l'émulsion mère que nous avons employée, le taux de 10^{-5} correspond à 100 spores environ au centimètre cube, le taux de 10^{-4} représente 1.000 spores par unité de volume. le taux de 10^{-3} , 10.000 ; le taux de 10^{-2} , 100.000 spores et 10^{-1} un million de spores. L'émulsion mère de par là même contient par centimètre cube 10.000.000 de spores.

2° TITRAGE SUR LES ANIMAUX RECEPTIFS

Nanti de ces résultats théoriques, que l'on peut considérer néanmoins comme d'une grande valeur pratique et très rapprochés de l'exactitude, nous avons entrepris le titrage de notre émulsion sur les animaux les plus réceptifs, à savoir : le cobaye et le lapin.

Nos animaux ont été inoculés deux par deux pour obvier aux variations individuelles de réceptivité. En outre nous avons déjà constaté que nos spores étaient encore vivantes malgré leur long séjour en sérum glyciné. Ce titrage doit nous faire savoir si elles sont encore virulentes.

EXPÉRIENCE I. — A. Cobayes. — Deux cobayes de 800 grammes ont été inoculés par voie sous-cutanée avec 2 centimètres cubes de solution au taux de 10^{-7} , soit environ 2 spores pour chaque cobaye.

Un premier cobaye meurt après 48 heures exactement, le second meurt en soixante heures environ.

B. Lapins. — Deux lapins de 1.520 grammes sont inoculés avec la même quantité du même matériel et par la même voie. Ces deux animaux n'ont présenté aucun symptôme de maladie même après trois jours et ont continué à se maintenir en excellente santé.

Nous pourrions dès lors considérer la dose de 2 centimètres cubes de la dilution au taux de 10-7 de notre émulsion mère comme capable de tuer le cobaye adulte de 800 grammes en 48 heures. La virulence de nos spores vis-à-vis du cobaye est donc duement établie.

EXPÉRIENCE II. — Il nous fallait obtenir le titre mortel pour le lapin. A cet effet, nous avons poursuivi nos inoculations chez cet animal avec une dilution à un taux supérieur.

Deux lapins de 1.450 grammes sont inoculés au même moment et par la même voie (sous-cutanée) avec 2 centimètres cubes de dilution au taux de 10-6, soit 20 spores environ pour chacun. D'un point de vue de contrôle uniquement nous avons inoculé deux cobayes du même poids que les animaux utilisés précédemment avec la même dose du même matériel, par la même voie.

Ces animaux (cobayes) sont morts de trente-six à quarante heures avec les signes cliniques caractéristiques, œdème spécifique, etc., et avec hémocultures positives et préparations colorées faites à partir de la pulpe de rate, excessivement riches en germes.

Nos lapins sont morts après soixante heures. Les hémocultures pratiquées ont été positives ainsi que le diagnostic microscopique effectué sur des préparations colorées à partir du sang et de la rate.

Par ce deuxième groupe d'expérience, nous avons établi le titrage mortel de notre émulsion mère pour le lapin qui est tel que 2 centimètre cube de solution au taux de 10-6 injectés par voie sous-cutanée font mourir le lapin de 1.450 grammes en soixante heures.

CONCLUSIONS. — Nous pouvons donc conclure d'après les faits précédents que :

1° Malgré leur long séjour en sérum glycérimé, les spores sont virulentes pour les animaux réceptifs à un taux de dilution très faible, tandis que sans aucun doute les souillures ont été détruites d'une façon radicale et complète.

2° Nous saurons qu'il faut une dose de 2 centimètres cubes de dilution au taux de 10-7 de notre émulsion mère pour tuer un cobaye de 800 grammes en quarante-huit heures, par injection sous-cutanée ;

Qu'il faut 2 centimètres cubes de dilution au taux de 10-6 pour tuer un lapin de 1.450 grammes, en soixante heures, par voie sous-cutanée.

Nous avons obtenu ainsi les doses minima mortelles pour le lapin et le cobaye d'un virus duement déterminé, défini de la façon la plus exacte que possible d'une virulence mesurée aussi rigoureusement que possible.

Ce matériel ainsi établi, doit, s'il ne contient que des spores, qui sont la forme immuable du virus charbonneux, rester identique à lui-même dans toutes ses propriétés, même en sérum glycérimé, stable pendant longtemps. Il doit donc être susceptible de conservation. Le paragraphe suivant nous montrera, par quelques expériences, les conditions de conservation.

V. — Conditions de conservation du matériel sporulé.

Ces suspensions ainsi titrées doivent rester identiques à elles-mêmes dans leurs effets et dans leur état : *toujours sous la forme sporulée, toujours pures et toujours virulentes*. C'est-à-dire qu'il est nécessaire de déterminer un mode de conservation susceptible de laisser intacte leur virulence et qui permette de contrôler l'état de cette virulence. A cet effet, nous avons entrepris l'expérimentation qui suit :

1° RECHERCHE D'UNE TEMPERATURE OPTIMA

Nous avons essayé de déterminer quelques-unes des conditions physico-chimiques de conservation de notre émulsion, capables de réaliser pour elle les conditions énoncées ci-dessus.

Pour ce faire, nous avons réparti nos spores émulsionnées en sérum physiologique glyciné, en ampoules de 2 centimètres cubes et nous avons divisé ces ampoules en cinq lots. Chaque lot a été placé à une température différente, à l'obscurité complète :

Un lot à l'étuve à 37° ;

Un lot à l'étuve à 30° ;

Un lot à l'étuve à 22° ;

Un lot à la glacière à 10° ;

Un lot à la glacière à 0°.

Afin de nous rendre compte de l'action de la température sur nos spores, nous les avons maintenues dans les conditions ci-dessus pendant onze mois.

Au cours de ces onze mois nous avons procédé pour chacun des lots à trois titrages consécutifs sur le lapin et le cobaye en procédant chaque fois aux dilutions convenables effectuées toujours dans les conditions indiquées plus haut, au paragraphe précédent.

A. Titrage après trois mois de séjour aux diverses températures (18 décembre 1930).

Les animaux utilisés ont été choisis d'un poids identique à celui des cobayes et lapins qui avaient servi au premier titrage. Chacun d'eux, en outre, a reçu la même dose de la même dilution que celle employée dans nos expériences précédentes. Voici les résultats de ce titrage :

1° *Lapins*. — Inoculés avec 2 centimètres cubes de dilution au taux de 10-6 par voie sous-cutanée.

Spores à 37°	mort en 66 heures
— 30°	— 63 —
— 22°	— 58 —
— 10°	— 63 —
— 0°	— 60 —

2s *Cobayes*. — Inoculés avec 2 centimètres cubes de dilution au taux de 10-7 par voie sous-cutanée.

Spores à 37°	mort en 70 heures
— 30°	— 68 —
— 22°	— 60 —
— 10°	— 58 —
— 0°	— 52 —

Par la culture et des préparations colorées faites avec du sang de rate, nous avons pu nous assurer que chacun de ces animaux avait bien succombé au charbon bactérien.

Du point de vue de la virulence, nous pouvons croire qu'elle n'a pas varié, du moins en ce qui concerne les températures basses. Aux températures plus élevées de 30 et 37°, les spores semblent un peu atténuées surtout si l'on envisage le temps dans lequel les animaux inoculés sont morts.

B. *Titrage après six mois de séjour aux diverses températures* (25 mars 1931).

Titrage effectué rigoureusement dans les mêmes conditions que ci-dessus. Voici succinctement les données de l'expérience :

1° *Lapins*. — 2 centimètres cubes de dilution à 10-6 :

Spores à 37°	animal mort en 87 heures
— 22°	— 76 —
— 30°	— 82 —
— 10°	— 80 —
— 0°	— 65 —

2° *Cobayes*. — 2 centimètres cubes de dilution à 10-7.

Spores à 37°	animal mort en 87 heures
— 30°	— — 66 —
— 22°	— — 66 —
— 10°	— — 68 —
— 0°	— — 54 —

Les animaux morts ont fourni des hémocultures positives et des frottis de sang et de rate qui ont pris le Gram. Pour chacun d'eux la thermo-réaction d'Ascoli s'est également montrée positive.

C. *Titration après onze mois de séjour aux diverses températures* (22 août 1931).

1° *Lapins*. — 2 centimètres cubes de dilution à 10-6.

Spores à 37°.	— L'animal n'est pas mort après quatre jours. Il a survécu à l'inoculation.
— 30°	animal mort en 4 jours
— 22°	— — 4 —
— 10°	— — 4 —
— 0°	— — 65 heures

2° *Cobayes*. — Inoculés avec 2 cc. de dilution à 10-7°.

Spores à 37°.	— L'animal n'est pas mort après quatre jours et a survécu.
— 30°	animal mort en 4 jours
— 22°	— — 4 —
— 10°	— — 3 —
— 0°	— — 60 heures

Les hémocultures de contrôle se sont montrées positives ainsi que les préparations colorées.

De ces divers titrages nous pouvons tirer plusieurs indications intéressantes en ce qui concerne la température de conservation des spores pures en sérum glyciné.

Après trois mois de séjour aux diverses températures les résultats ne sont pas sensiblement modifiés.

Après six mois nous pouvons voir que les animaux inoculés avec le matériel virulent exposé aux influences des plus hautes températures mettent beaucoup plus de temps à mourir que ceux inoculés avec le même matériel maintenu aux températures basses. A 0°, les animaux meurent dans un temps à peu près égal à celui constaté lors de notre titrage primitif.

Enfin notre troisième titrage nous montre que la virulence de l'émulsion a baissé après un séjour de onze mois à 37° par suite de la mort d'un certain nombre de spores. Les animaux réceptifs inoculés aux taux de 10-7 et 10-6 ne réagissent plus. Ils étaient vivants après quatre jours et ont survécu.

Tandis que les lapins et cobayes inoculés avec le matériel exposé à 0° pendant onze mois sont morts dans un temps à peu près immuable concordant au temps relevé lors du titrage d'origine. Les différences légères que l'on peut relever à ce sujet pourraient sans doute être rapportées aux variations des réactions individuelles vis-à-vis des mêmes germes pathogènes. C'est une question que nous envisagerons dans un paragraphe prochain. Aux autres températures, les spores se sont montrées légèrement atténuées mais encore très virulentes.

Nous pouvons donc conclure qu'à tout prendre la question de température n'est peut-être pas primordiale, du moins envisagée dans le temps, car même à des températures relativement élevées, les spores se maintiennent égales à elles-mêmes. Néanmoins nous pouvons dire avec raison — et nos expériences le prouvent — que l'émulsion se conserve le mieux identique à elle-même pendant fort longtemps, c'est-à-dire stable et virulente, aux mêmes taux que lors de notre titrage primitif, si elle est conservée à une basse température et notamment à 0°, température que nous choisirons comme condition optima d'une bonne conservation.

2° RECHERCHES SUR LINFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LES SPORES EN SERUM GLYCERINE

Après avoir déterminé la température optima de conservation, il nous a semblé intéressant de nous rendre compte de l'action de la lumière sur les spores.

Cette idée n'est pas nouvelle et déjà de nombreux auteurs s'en sont occupé.

Cette question en effet fut envisagée dès 1886 par STRAUS (80), puis successivement par ROUX (81), S. ARLOING (82), MOMONT (83). STRAUS, dans sa note, rapporte ses propres expériences sur le sujet et celles d'ARLOING qu'il s'efforce de contrôler. Il constate d'une part, et ceci en complet accord avec ARLOING, que l'exposition aux rayons vifs du soleil de spores puresensemencées en bouillon, entraîne la stérilisation de ces spores après deux ou trois heures. Tandis que d'autre part, les mêmes spores pures placées dans des ballons contenant en même épaisseur de l'eau distillée stérilisée, liquide nullement nutritif et incapable de servir à un développement quelconque de la spore et exposées au soleil, sont encore vivantes après huit heures.

La première hypothèse s'explique pour ces auteurs par ce fait que le soleil agit sur la spore alors qu'elle est en train de végéter, sur le mycélium naissant, extrêmement fragile à la lumière, encore plus que l'élément adulte : le bacille.

La seconde expérience s'explique par le fait que la spore placée en un milieu qui ne permet pas son développement reste immuablement à l'état de spore et résiste à l'action de la lumière.

STRAUS conclut :

« Il ne paraît pas y avoir pour la spore de *bacillus anthracis* une vulnérabilité particulière à l'égard des rayons solaires, contrastant avec son grand pouvoir de résistance aux autres agents cosmiques, vulnérabilité plus apparente que réelle dans l'expérience de M. ARLOING. »

Nous oserons cependant avancer que cette vulnérabilité est réelle du moins sous certaines conditions. En effet, dans le but de fixer les idées sur le rôle combiné du sérum physiologique glycérimé et de la lumière solaire nous avons procédé à quelques expériences dont voici succinctement rapportées les grandes lignes.

Nous avons montré précédemment comment nous pouvons obtenir des spores pures débarrassées de toute trace de mycélium par l'action du sérum physiologique glycérimé qui reste sans influence sur la spore et qui est un milieu ne permettant en aucune manière son développement ultérieur. Nous étions donc placé à ce point de vue particulier dans les mêmes conditions, voire même dans des conditions meilleures que STRAUS pour entreprendre les mêmes expériences.

EXPÉRIENCE. — Nous avons mis en ampoules de 2 centimètres cubes ordinaires en verre mince, une émulsion en sérum glycérimé de spores charbonneuses virulentes.

Ces ampoules ont été exposées à la lumière de façon à recevoir chaque jour environ six heures de lumière pure du soleil d'été (août, septembre au Maroc) et six heures de lumière diffuse.

L'insolation des ampoules a eu lieu suivant une méthode un peu particulière. Nos expositions au soleil ont été faites du 25 août au 13 septembre 1931. Durant ce laps de temps, chaque jour, une ampoule fut placée au soleil. De sorte que, au 14 septembre, nous avions à notre disposition une série d'ampoules dont chacune avait subi l'influence de la lumière solaire pendant un nombre de jours croissant, c'est-à-dire que l'ampoule exposée au soleil le 13 septembre n'a subi qu'un jour d'insolation, que celle exposée le 12 a subi deux jours d'insolation, celle exposée le 6 a subi huit jours d'insolation, etc...

Nous avons alors entrepris de vérifier par la culture d'abord, par des inoculations ensuite, la vitalité et la virulence des spores ainsi insolées, au sein du liquide conservateur.

Avec le contenu de chaque ampoule nous avonsensemencé deux tubes de gélose. Ces tubes ont été maintenus à l'étuve à 37° pendant quarante-huit heures. Après ce temps nous avons relevé les données groupées dans le tableau suivant :

Dates de l'exposition à la lumière	Durée de l'exposition à la lumière	Résultats des ensemencements
25 août 1931	20 jours	Cultures stériles
26 — —	19 —	—
27 — —	18 —	—
28 — —	17 —	—
29 — —	16 —	—
30 — —	15 —	—
31 — —	14 —	—
1 septembre 1931	13 —	—
2 — —	12 —	—
3 — —	11 —	—
4 — —	10 —	—
5 — —	9 —	—
6 — —	8 —	—
7 — —	7 —	Cultures positives
8 — —	6 —	+
9 — —	5 —	+
10 — —	4 —	+
11 — —	3 —	+
12 — —	2 —	+
13 — —	1 jour	+

Par ces résultats nous pouvons nous rendre compte aisément que la stérilisation des spores en sérum glyciné est une réalité. Nous pouvons en effet constater qu'il faut huit jours d'insolation envisagée dans les circonstances où nous l'avons fait, pour rendre inoffensives des spores charbonneuses. Par un simple calcul et pour plus de précision nous pouvons dire qu'il a fallu l'influence de quarante-huit heures de soleil effectif et de quarante-huit heures de lumière diffuse,

soit quatre-vingt-seize heures d'exposition à la lumière, pour stériliser notre matériel virulent.

Pour atteindre à plus d'exactitude dans ces résultats, nous avons procédé à une contre-épreuve :

Nous avons prolongé de deux jours l'insolation pour les ampoules exposées du 7 au 13 septembre et après ce laps de temps nous avonsensemencé le contenu des ampoules sur gélose nutritive. Nous avons pu constater ainsi que les éléments qui étaient encore vivants lors du contrôle établi ci-dessus et qui marquaient la limite de survie, c'est-à-dire les ampoules exposées les 7, 8, 9, 10, etc., étaient à leur tour stérilisées dans un ordre déterminé.

Le matériel exposé le 7 était stérile.

Le matériel exposé le 8 était stérile.

Le matériel exposé le 9 a fourni une culture abondante ainsi que les éléments suivants, dans la série.

Enfin l'inoculation d'animaux réceptifs nous a permis de confirmer ces données. Avec les produits exposés huit, dix, quinze jours, à la vive lumière, nous avons inoculé des lapins par voie sous-cutanée. Ces animaux sont restés vivants.

En outre, pour pallier aux inconvénients signalés par de CHRISTMAS (84) et d'autre part par E. MORRISON et R. RETTGER (85) concernant le sommeil des spores ensemencées, nous avons maintenu pendant quinze jours consécutifs à l'étuve à 37° nos ensemencements de contrôle. Après ce laps de temps les résultats observés après quarante-huit heures sont restés inchangés, aucun des tubes reconnus stériles à ce moment là n'a montré de cultures après quinze jours.

En résumé, contrairement à l'avis exprimé par STRAUS et bien qu'il soit prouvé que la spore de la bactériodie charbonneuse résiste à toutes les influences cosmiques étudiées jusqu'ici : chaleur, dessication, putréfaction, etc..., il est permis de penser néanmoins en présence des résultats fournis par l'expérimentation, que la spore charbonneuse en sérum glyceriné est sensible à la lumière comme tout autre germe. Elle y

est moins sensible que le mycélium qui, lui, est tué en quelques heures, mais elle subit tout de même assez rapidement ses influences bactéricides.

Et ceci a, à notre sens, une grande importance du point de vue pratique. Il est indispensable d'éviter de conserver à la lumière des ampoules de vaccin même sporulé, car il pourrait se produire au sein du liquide conservateur, sous l'influence de l'insolation directe ou des rayons d'irradiation diffuse une atténuation plus ou moins accusée des germes pouvant même aller le cas échéant jusqu'à la stérilisation complète des éléments vivants et virulents de l'émulsion vaccinale.

Avant de conclure nous indiquerons un fait d'ordre pratique. Nous avons tenu à vérifier le taux en NaCl du sérum physiologique glycérimé utilisé comme milieu conservateur de nos spores virulentes. La concentration moléculaire de ce milieu est évidemment différente de celle du sérum ordinaire salé à 8 ou 9 p. 1.000. Par une méthode précédemment indiquée (méthode utilisant le chromate de potasse et l'azotate d'argent), nous avons titré la solution. Nous avons pu noter de cette façon que le taux en NaCl de notre liquide d'émulsion était de 2 gr. 57 p. 1.000. L'action conservatrice et bactéricide à la fois d'une telle solution est due à la glycérine pour une très forte part, ceci est démontré. Mais on pourrait admettre et cela viendrait à l'appui des hypothèses de MM. PANISSET et VERGE (86) sur l'influence du chlorure de sodium sur les microbes pathogènes, que cette action de la glycérine est peut-être renforcée par celle du sérum physiologique, malgré l'abaissement du taux de NaCl de cette solution ainsi constituée, comparativement à celui du sérum physiologique pur.

En résumé, nous avons vérifié la possibilité d'obtenir un matériel virulent stable, immuable, duement déterminé, qui, placé au froid à 0° et à l'abri de la lumière peut se conserver indéfiniment égal à lui-même. Ce matériel précis va nous permettre d'étudier l'action pathogène de la bactériémie charbonneuse, aux divers points de vue envisagés dans notre Préface.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA VIRULENCE DE LA BACTERIDIE CHARBONNEUSE EN FONCTION DU GERME.

Dans la Préface de ce travail nous avons essayé de définir d'une façon aussi rationnelle que possible le terme de « virulence » et nous avons vu que, pour un même germe pathogène le terme de virulence ne doit impliquer dans tous les cas qu'une dualité bien déterminée, envisagée par rapport au microbe d'une part (nature et quantité), et à l'individu qui reçoit l'élément virulent, d'autre part. Nous sommes resté pour cette étude dans le cadre pratique de ces définitions et dans ce chapitre nous avons poursuivi l'étude de la virulence de *bacillus anthracis* en fonction du germe pris en lui-même.

Cette étude un peu particulière qui va fournir la matière de tout ce chapitre a été envisagée suivant un plan déterminé et sur des bases purement expérimentales.

Il nous fallait pour les besoins de notre expérimentation, plusieurs souches différentes de charbon bactérien, souches nécessairement de diverses origines. Elles nous ont été fournies par le laboratoire de Casablanca, grâce à la bienveillante amabilité de son directeur, M. le docteur H. VELU.

Voici brièvement exposés les caractères d'origine et la nature de ces souches :

Souches F¹ 29. — Souche de collection de l'Institut Pasteur de Paris : charbon français.

Souche F¹ 30. — Souche de charbon français provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, également de collection, est à peu près identique à la première.

Souche N° 6. — Souche de charbon marocain, isolée du porc en 1923.

Souche N° 19. — Souche de charbon marocain, isolée du bœuf en 1923.

Ces deux souches identiques sont des virus de collection, provenant de régions différentes, ayant subi de nombreux repiquages et de non moins nombreux passages.

Souche N° 36. — Souche marocaine, isolée du bœuf le 8 août 1931, provenant de la région de Rabat.

Souche N° 37. — Souche marocaine, isolée du mouton en juillet 1931.

Ces souches récemment isolées n'avaient jamais subi aucun repiquage ou passage au moment de leur utilisation.

Pour nous conformer en tous points, d'un bout à l'autre de nos manipulations, à la méthode que nous avons choisie et exposée dans le détail au début du précédent chapitre, il nous fallait tout d'abord obtenir de ces souches des cultures sporulées, conditions de leur utilisation ultérieure.

Comme nous l'avions précédemment fait, les souches après repiquage et ensemencement en bouillon ordinaire ont été ensemencées en boîtes de Roux de 250 centimètres cubes contenant le milieu sporogène choisi dans un précédent chapitre (chapitre II), à raison de trois boîtes par souche.

Une fois ensemencées ces boîtes ont été placées à l'étuve à 30° pendant soixante-douze heures, température que nous avons choisie comme étant la plus propice à une sporulation abondante pendant le temps indiqué.

Au cours de ces trois jours nous avons procédé de vingt-quatre en vingt-quatre heures au contrôle de la marche de la sporulation et nous avons pu retirer de ces examens consécutifs les données pratiques suivantes, à savoir : que plusieurs souches différentes d'origine, placées dans des conditions de milieu et de température rigoureusement identiques, ne sporulent pas de la même façon, pour ce qui est du temps et de la quantité de spores obtenues.

Après le même temps de séjour à 30°, aucune de ces souches ne se présentait à un stade identique de sporulation, du moins d'après ce que nous avons pu en juger au moyen du microscope et de préparations colorées. La souche 6 était parfaitement sporulée, alors que les autres accusaient une sporulation moins complète, moins homogène de l'une à l'autre, approchant à peine le taux de 80 à 90 % d'éléments sporulés, préconisé par THEILER pour l'obtention d'un matériel de cette sorte. Les éléments en bâtonnets y sont encore nombreux comparative-ment à ce qu'il nous était donné d'observer sur les prélèvements faits à partir de la souche 6.

Malgré tout, après huit jours de maintien à la température du laboratoire, nous avons des spores dans toutes nos cultures en quantité suffisante, et par cela même notre but était atteint.

Le produit de chacune des boîtes de Roux est récolté au moyen de billes de verre.

Chaque souche a été recueillie dans 40 grammes de sérum physiologique, auxquels furent ajoutés le double de glycérine stérile en poids.

Ces émulsions ainsi constituées ont été placées à l'étuve à 37° pendant vingt jours pour stériliser le mycélium.

Après ce temps il nous fallait rendre identiques et comparables entre elles, ces différentes souches ne renfermant plus que des spores vivantes pures, quant au nombre de germes par unité de volume.

I. — EXPERIENCES

Ces émulsions ont été primitivement comparées entre elles du point de vue de l'opacité par examens faits à contre-jour, après avoir établi pour chacune d'elles une dilution au 1/10, dont nous avons choisi la moins dense comme test de comparaison. Par des dilutions appropriées, nous avons ramené toutes ces émulsions à la même opacité, en respectant néan-

moins la constitution primitive du milieu émulsionnant, dont les proportions ont été maintenues inchangées.

II. — DILUTIONS ET NUMERATIONS

Nous avons utilisé comme méthode de numération celle qui a recours à l'ensemencement d'une dilution donnée sur gélose, en boîtes de Pétri.

Chacune des émulsions de chaque souche, après son séjour à 37° en sérum glyciné, a subi des dilutions successives jusqu'aux taux de 10-7 et de 10-8, afin de permettre une numération commode du nombre de germes par unité de volume. Il faut signaler que les dilutions ont été faites en sérum physiologique pur, mais on pourrait les faire en sérum glyciné.

A partir du taux de dilution de 10-7 et pour chaque souche, nous avonsensemencé deux boîtes de Pétri avec 1 centimètre cube de l'émulsion obtenue. Après quarante-huit heures de séjour à l'étuve à 37°, nous avons entrepris la numération des germes sur chaque groupe de boîtes.

Nous avons pu relever les données condensées dans le tableau suivant :

TABLEAU I

Nombre de spores par centimètre cube				
Dilutions	F ¹	Souche 6	Souche 19	Souche 36
10-7	16,5	9,5	8,5	9,75
10-8	1	1	1	1,25

De cette manière nous saurons, avec le minimum d'erreur possible et très approximativement, le nombre d'éléments que nous inoculerons aux animaux sensibles dans les expériences qui vont suivre.

III. — INOCULATIONS

Muni de ces données nous avons entrepris le titrage, sur le lapin, de nos émulsions numérees afin de déterminer pour cet animal la dose minima mortelle de chacune de nos souches.

Nous avons pris soin de choisir pour établir ces doses minima mortelles des animaux rigoureusement identiques entre eux, du poids de 1.500 grammes.

Ces animaux ont été inoculés par voie sous-cutanée avec des dilutions variables et à raison de plusieurs animaux par taux de dilution.

Ces inoculations, après de longs tâtonnements, nous ont permis d'établir de la façon la plus exacte que possible les données suivantes :

1° Pour la souche F¹ la dose minima mortelle pour le lapin est de 1 centimètre cube de la solution mère faite en sérum glyciné, ce qui correspond d'après les numérations à 165 millions de spores. Les animaux inoculés sont morts en quatre jours après avoir présenté une réaction locale très forte.

2° Pour la souche 19 la dose minima mortelle pour le lapin a été de 1 centimètre cube de la dilution au taux de 10-4 faite en sérum physiologique pur et inoculé par voie sous-cutanée. Les animaux sont morts en quatre jours avec hémocultures positives. Correspond à 8.500 spores par centimètre cube.

3° La souche N° 6 a provoqué la mort des lapins inoculés avec 1 centimètre cube de la dilution à 10-3, en quatre jours. Correspond à 95.000 spores par centimètre cube.

4° Enfin la souche 36 a fait mourir les animaux inoculés à la dose de 1 centimètre cube de la dilution à 10-4 et en quatre jours également. Correspond à 9.750 spores par centimètre cube.

Le tableau suivant résume les résultats des inoculations :

TABLEAU II

Dilutions	Souche F ¹	Souche 6	Souche 19	Souche 36
10 ⁻⁸	2 lapins ont survécu	2 lapins ont survécu	2 lapins ont survécu	2 lapins ont survécu
10 ⁻⁷	—	—	—	—
10 ⁻⁶	—	—	—	—
10 ⁻⁵	—	—	—	3 lapins ont survécu 1 lapin mort en 5 jours
10 ⁻⁴	3 lapins ont survécu	3 lapins ont survécu 1 lapin : réaction légère a survécu	4 lapins sont morts entre 3 jours et 4 jours	4 lapins sont morts (3 en 4 jours, 1 en 3 jours)
10 ⁻³	—	2 lapins sont morts en 4 jours	—	2 lapins morts en 4 jours
10 ⁻²	—	—	—	—
10 ⁻¹	—	—	—	—
Solution mère	3 lapins sont morts (1 en 3 jours, 2 en 4 jours)			

Comme on peut s'en rendre compte, tous ces animaux sont morts dans le même temps, à quelques heures près. Des préparations colorées et des hémocultures ont permis de vérifier qu'ils étaient bien morts de septicémie charbonneuse.

En résumé, suivant l'origine et la nature du germe utilisé, la virulence est variable vis-à-vis d'un animal d'une espèce définie ; cette virulence varie avec l'origine puisqu'il a fallu utiliser des dilutions de plus en plus fortes au cours du titrage de la souche F¹, souche française de collection, et aller jusqu'à la dose de 1 centimètre cube de l'émulsion mère pour obtenir

une réaction locale énorme sur le lapin, suivie de mort dans les quatre jours consécutifs, alors que la dilution inférieure à 10-1 ne donnait absolument rien en fait de réaction. Tandis que par ailleurs les dilutions à 10-3 et 10-4 des souches 6 et 19 (virus marocain de collection) et 36 récemment isolée, ont suffi pour provoquer la mort de lapins identiques dans le même temps.

Bien plus éloquente est encore la différence, si l'on envisage le nombre des germes de chaque souche inoculés à chaque fois, comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU III
Doses mortelles chez le lapin

par 1 cc. de dilution	Souche F ¹	Souche 6	Souche 19	Souche 36
Solution mère	165 millions de spores			
10- ³	»	95.000 spores		
10- ⁴	»	»	8.500 spores	9.750 spores

C'est donc bien sur le compte d'une différence notoire de virulence du germe lui-même, qu'il faut mettre les différences de réaction des individus inoculés.

En outre ces expériences comparées à celles du titrage que nous avons exposé dans notre précédent chapitre viennent, par la nouvelle preuve qu'elles constituent, plaider en faveur d'une hypothèse déjà connue.

Elles démontrent que, s'il est admis par tous que le cobaye, dont la sensibilité à la bactériémie charbonneuse est extraordinaire, est facilement tué avec une unité virulente (1 spore environ), il n'en est rien pour le lapin qui survit à l'inoculation de 9.750 spores, ce qui démontre une réceptivité plus

atténuée vis-à-vis de l'agent pathogène envisagé. Il faut, pour que le lapin succombe de septicémie charbonneuse, lui inoculer un nombre déterminé et minimum de spores au-dessous duquel on ne produit jamais la mort quelle que soit la qualité pathogène du virus utilisé et qui doit être envisagé comme supérieur à dix dans tous les cas, indépendamment de la nature pathogène et de l'origine de la souche utilisée.

C'est à partir de ce minimum qu'il faut tabler pour mesurer la virulence d'un germe charbonneux déterminé.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA VIRULENCE EN FONCTION DE L'ORGANISME INFECTÉ.

Après avoir démontré les variations de la virulence de l'agent de la fièvre charbonneuse à l'égard d'un animal déterminé, — faits que nous avons duement constaté dans les expériences précédentes, — il nous a semblé nécessaire pour compléter notre travail et pour la clarté de nos conclusions, d'envisager dans un dernier chapitre l'étude de la virulence de la bactérie charbonneuse, en fonction de l'organisme infecté en tenant compte des diverses particularités qu'implique cette notion d'organisme, c'est-à-dire l'espèce, l'individu dans une même espèce, enfin la race.

1° INFLUENCE DE L'ESPECE

Nous nous bornerons à rappeler ici que les données classiques bien établies et duement constatées au sujet des différences de réceptivité manifestées par les espèces animales, domestiques et sauvages, vis-à-vis du charbon bactérien.

Il n'est point besoin de citer avec précision telle ou telle référence bibliographique spéciale en ce qui concerne la réceptivité particulière du cobaye. Toute l'histoire du charbon lui est évidemment liée. C'est un fait essentiellement connu que cet animal meurt dès qu'il est inoculé avec du charbon virulent quelle que soit la souche et si minime que soit la dose. Nous avons vu qu'une spore suffit pour produire la mort. On sait aussi qu'on ne peut vacciner le cobaye de manière efficace par aucun moyen pratique ; sa sensibilité se manifeste

à des doses mêmes infimes de premier vaccin pourtant très atténué.

Les inoculations permettent de déceler chez le lapin une réceptivité moindre que celle du cobaye puisqu'il résiste à l'inoculation du deuxième vaccin pasteurien.

Parmi les animaux d'élevage, nous ne ferons que citer la réceptivité du mouton, du cheval et du bœuf, sans insister davantage. Nous envisagerons le cas particulier de la chèvre dont la réceptivité a souvent donné lieu à des controverses, surtout au sujet de sa vaccination.

En effet, on a longtemps cru que la chèvre résistait à l'infection par l'agent de la fièvre charbonneuse en s'appuyant, pour établir cette hypothèse, sur une immunité naturelle spécifique de cet animal d'une part, et en invoquant en second lieu le mode spécial de pâture de cette espèce : la chèvre, en effet, ne broute pas volontiers les aliments qui poussent au ras du sol comme le mouton ou le bœuf ; par ce fait les chances d'infection sont donc de beaucoup diminuées, presque réduites à néant. Puis on s'est rendu compte par la suite que la chèvre était sensible au charbon, si sensible même que chaque fois que l'on a essayé de la vacciner avec du virus ordinaire non approprié, on n'y est jamais parvenu. Elle ne résiste pas au deuxième vaccin pasteurien. Les essais signalés par CLAVERIE (87) en 1926, puis par FORGEOT (88) en 1927) en font foi. Le premier de ces auteurs constate dans son rapport que 114 chèvres sur 217 vaccinées, succombent à la suite de l'inoculation des vaccins pasteuriens N^{os} 2 et 3, à la dose de 1/8 de centimètre cube. Ailleurs, sur 54 animaux vaccinés, 27 chèvres succombent cinq jours après la vaccination et l'auteur conclut :

« L'intradermovaccination avec le deuxième vaccin de l'Institut Pasteur aux doses de 1/8 à 1/4 de centimètre cube donne d'excellents résultats sur les bovins et ovins. Par contre, cette vaccination est *dangerouse* pour les caprins qui peuvent succomber quatre ou cinq jours après la vaccination dans les proportions de 50 %. »

Ces lignes prouvent combien la chèvre est réceptive au charbon comparativement au mouton, par exemple, ce qui constitue une preuve de variation de réceptivité du point de vue de l'espèce vis-à-vis d'un même matériel virulent.

FORGEOT apporte également une preuve non moins éloquente de cette sensibilité presque spéciale de la chèvre. L'auteur inocule d'abord deux chèvres avec 1/8 de centimètre cube de deuxième vaccin pasteurien dans le derme de la queue. Il constate seulement une légère réaction fébrile semblable à celle que l'on constate chez le mouton avec 1/4 de centimètre cube du même produit. Puis d'autres chèvres sont inoculées de la même façon. Une chèvre meurt après vingt-quatre heures sans lésions spécifiques, mais les ensemencements en bouillon et glycérine faits à l'aide de prélèvements sont positifs ; une autre chèvre meurt également en quarante-huit heures sans lésions locales avec cultures également positives. Et l'auteur conclut :

« Les constatations faites par CLAVERIE s'appliquent à la chèvre de Turquie et montrent avec quelle prudence on doit agir quand on veut changer les méthodes anciennes de vaccination contre le charbon bactérien. »

Ces deux exemples suffisent à montrer la grande réceptivité de la chèvre au charbon bactérien. C'est à une réceptivité d'espèce toute spéciale qu'il semble logique d'attribuer les échecs d'essais de vaccination de cet animal et non à un changement de méthode de vaccination, comme FORGEOT semble le faire remarquer. Ceci témoigne de la nécessité ressentie par certains auteurs de trouver pour la chèvre un vaccin spécial « spécifique » même, très atténué, différent de celui du cheval et du bœuf, susceptible de lui conférer une immunité solide au prix d'une réaction minime et à l'abri de tout accident mortel. C'est ainsi que THEILER (89), le premier, a réussi à fabriquer un vaccin sporulé qui répond à toutes les conditions énoncées ci-dessus, méthode reprise au Maroc par VELU (89 bis).

Envisageant une autre espèce, nous pouvons voir par ailleurs, que le rat, animal que plusieurs auteurs se sont efforcés de faire mourir par l'inoculation de charbon virulent, se montre assez peu sensible à ces injections virulentes du point de vue réactionnel. On arrive à faire succomber cet animal de septicémie charbonneuse (URBAIN) (90), mais en utilisant des artifices spéciaux comme par exemple, la méthode des passages. Il est nécessaire en effet de faire effectuer jusqu'à soixante-dix passages sur le rat à une souche charbonneuse pour obtenir une exaltation du pouvoir pathogène de cette souche qui permette de tuer avec elle un rat, assez rapidement. Mais il est permis de penser malgré cela que, si on inoculait un de ces animaux avec une souche n'ayant pas subi de passages, il n'est pas douteux qu'il se montrerait d'une insensibilité parfaite à ce virus inoculé à des doses ordinaires, et ceci se trouve confirmé par les recherches de FUKUDA (91) sur l'infection charbonneuse du Rat. Cet auteur aurait fixé comme dose minima mortelle pour cet animal, trois cultures sur gélose inclinée. C'est-à-dire que sa culture, virulente à ce taux formidable, était à peu près inactive pour le rat. Plusieurs passages ont fait que cette souche tuait le même rat blanc à la dose d'un tiers d'anse.

Dans un même ordre d'idées et vis-à-vis d'une autre espèce, nos recherches nous ont permis de constater que les expériences de quelques auteurs montrent avec netteté combien le Chien est différemment réceptif à l'infection par la bactérie charbonneuse suivant le mode d'inoculation. Elles dénotent en tous cas une réceptivité restreinte pour ne pas dire nulle, surtout si elle est limitée aux possibilités de l'infection naturelle.

SANI (92) constate que par la voie digestive les chiens résistent au charbon bactérien puisque ces animaux présentent dans leurs excréments des éléments pathogènes jusqu'à vingt-six et trente-deux jours après l'ingestion de débris d'animaux morts de charbon.

MARTEL (93), démontre nettement que d'une manière générale le chien est réfractaire au charbon à l'exception des jeunes sujets (COLIN-STRAUS), tout en soulignant cependant que la résistance des chiens adultes est vaincue par l'infection expérimentale sous certaines conditions spéciales que nous ne rapporterons pas, dans lesquelles les sujets sont placés afin d'amoinrir leur condition physique et leur résistance, ou bien par la méthode des passages. En dehors de ces artifices, le chien semble réfractaire à l'infection naturelle.

C'est encore par artifice d'inoculation et sans mentionner la virulence comparée de sa souche vis-à-vis d'un animal réceptif que SANI (94) en recherchant les voies diverses susceptibles de donner l'infection charbonneuse au chien, fait périr cet animal avec une faible quantité de virus inoculée.

De ceci il résulte que sans être absolue, l'immunité naturelle du chien n'est que rarement vaincue dans les conditions ordinaires.

Enfin d'autres espèces sont encore sensibles au charbon bactérien et on a pu le constater sous forme de cas sporadiques ou enzootiques sur l'ours (REDKO) (95), sur le buffle (EYKMAN) (96), sur le canard et le chat dans une même exploitation (GERLACH) (97), sur le lion, le blaireau (MOUQUET) (98), et enfin sur l'autruche (ROBERTSON) (99).

Quoiqu'il en soit, il ne faut retenir qu'un principe utile de toutes les notions ici réunies. Tous les organismes ne se prêtent pas également bien à la culture féconde de la bactérie charbonneuse ou au développement qui en résulte. Avec chaque espèce la bactérie est susceptible de se comporter différemment du point de vue de la virulence. Nous avons vu que certaines espèces jouissent au plus haut degré de cette propriété et prennent infailliblement le charbon quelles que soient les conditions de l'inoculation. D'autres espèces au contraire paraissent réfractaires, à moins que l'inoculation n'ait été faite dans des conditions spéciales. Nous en avons rapporté de nombreux exemples ; nous citerons encore pour

clore leur liste celui de PASTEUR sur les poules refroidies, connu de tous.

Tous ces exemples ne semblent pas devoir être retenus comme probants et absolus, car du point de vue de l'immunité en général, aucune immunité naturelle contre telle ou telle affection, de même qu'aucune immunisation active transmise par un vaccin, ne résiste à l'inoculation expérimentale, par laquelle il est toujours possible d'inoculer des doses de virus énormes capables de vaincre en tous cas l'immunité naturelle ou l'immunisation transmise.

En second lieu, puisqu'il est avéré qu'il existe des réactions différentes des individus de chaque espèce par rapport à ceux d'une autre espèce, il semble logique d'admettre, dans les tentatives d'immunisation de chacune des espèces réceptives, la constitution d'un vaccin spécial, voire « spécifique » qui réponde exactement du point de vue de ses qualités immunisantes à la réaction provoquée par la maladie naturelle chez chaque espèce envisagée, et susceptible de contrebalancer les effets plus ou moins intenses de l'atteinte dans chaque espèce. Il est nécessaire d'envisager pour éviter les accidents consécutifs à une vaccination pas au point, la constitution d'émulsions vaccinales « titrées » spécialement pour combattre la fièvre charbonneuse chez les espèces les plus réceptives comme le cheval et la chèvre, que l'on serait tenté de rapprocher du point de vue réactionnel, mais qui diffèrent cependant du bœuf, du mouton, du porc. A chaque espèce son vaccin titré spécialement. Par l'emploi d'un matériel sporulé, virulent, numéré et titré, stable, facilement maniable, il semble possible d'envisager ces hypothèses avec quelque certitude de réussite.

2° INFLUENCE DE L'INDIVIDU

Il est logique de penser que les différences d'aptitudes à contracter le charbon n'existent peut-être pas seulement entre

les diverses espèces, mais encore entre les individus d'une même espèce.

Nous nous sommes proposé de faire ressortir certaines différences individuelles de réceptivité dans une même espèce, notions peut-être moins précises que celles que nous venons d'envisager. Pour confirmer ces hypothèses, nous ne ferons que rapporter certaines expériences entreprises au Laboratoire de Recherches de Casablanca, que nous devons faire pour notre propre compte si le temps nous l'avait permis et que nous devons au docteur H. VELU, directeur de ce laboratoire.

EXPÉRIENCE I

Nous avons pu observer dans le cas particulier sur le cobaye, des différences notoires dans les réactions de chaque individu avec la même souche:

Il s'agit du titrage sur le cobaye d'une souche vaccinale pour le cheval, sporulée, préparée suivant la méthode de THEILER, dont la virulence doit être telle que les cobayes inoculés avec 1/10 de centimètre cube de l'émulsion mère doivent succomber alors que les cobayes inoculés avec 1/100 de centimètre cube doivent survivre.

Trois cobayes de 500 grammes chacun sont inoculés avec des doses différentes par voie sous-cutanée :

Cobaye 296 reçoit 1/10 de cc. de l'émulsion.	
Cobaye 247 reçoit 1/100 —	—
Cobaye 248 reçoit 1/1000 —	—

Le cobaye 296 meurt en cinq jours comme il fallait s'y attendre, avec évolution et signes cliniques locaux normaux.

Le cobaye 247 a survécu.

Le cobaye 248 est mort le huitième jour dans réaction locale, mais il présentait des bactériemies dans la rate et dans le sang.

Quant au sujet 247, qui normalement aurait dû mourir dans le cas particulier, puisque le sujet 248 qui avait reçu une dose dix fois plus petite que lui avait succombé au charbon, il

a présenté le neuvième jour après l'inoculation, une réaction ganglionnaire de la grosseur d'une noisette au niveau du ganglion précrural correspondant au côté où avait été faite l'injection. Cette réaction purement locale, a légèrement progressé puis s'est résorbée totalement.

Ceci constitue un exemple typique de variation dans la réceptivité individuelle vis-à-vis d'une souche identique bien déterminée.

EXPÉRIENCE II

Cette expérience a porté sur des animaux d'une autre espèce: les lapins.

Cinq lapins sont inoculés en février 1931. Chacun d'eux a reçu 1 centimètre cube d'une dilution à 10-7, d'une émulsion mère sporulée provenant d'une souche de charbon virulent de race locale. Toutes les dilutions intermédiaires ont été faites en sérum physiologique en portant 1 centimètre cube de l'émulsion supérieure dans 9 centimètres cubes du milieu devant servir à la dilution suivante.

Cette dilution à 10-7 représentait exactement en moyenne trente spores, huit au centimètre cube. Ces données ont été acquises au moyen de numérations faites par la méthode des boîtes de Pétri.

Dix boîtes de Pétri ont étéensemencées chacune avec 1 centimètre cube d'une pipette de 10 centimètres cubes contenant la dilution à 10-7, les 10 centimètres cubes ayant été de ce fait,ensemencés en entier.

Voici ce qui a été relevé après quarante-huit heures de séjour à l'étuve :

Boîte 1.....	35 colonies
— 2.....	31 —
— 3.....	29 —
— 4.....	27 —
— 5.....	26 —
— 6.....	32 —
— 7.....	31 —

— 8.....	30	—
— 9.....	36	—
— 10.....	31	—

L'écart maximum, comme on peut le constater étant de six unités seulement en une seule boîte, on peut donc affirmer qu'à neuf spores près au maximum, chaque animal a reçu la même quantité d'éléments virulents.

Ces animaux ont fourni les réactions suivantes :

Lapin N° 1. — Mort en trois jours avec réaction locale nette et frottis positifs.

Lapin N° 2. — Mort en quatre jours.

Lapin N° 3. — Mort en dix jours sans réaction locale, avec seulement une légère réaction ganglionnaire. Il a été nécessaire de faire des frottis de rate et des hémocultures pour vérifier la cause de la mort. Les unes et les autres ont démontré la présence du charbon.

Lapin N° 4. — *A survécu.*

Lapin N° 5. — *A survécu.*

Si d'une part, l'on considère que ces cinq animaux étaient absolument neufs, n'ayant jamais servi à aucune autre expérience ; si d'autre part, on envisage le faible écart possible entre le nombre de spores injectées à chacun de ces lapins ; enfin en considérant les réactions variables de chacun des individus à l'égard d'un même virus inoculé en même quantité, on ne peut que conclure à la variété des réactions individuelles des animaux d'une même espèce vis-à-vis du charbon, à une réceptivité essentiellement variable d'un sujet à l'autre.

EXPÉRIENCE III

Des expériences identiques ont été poussées sur le cobaye à l'aide de la même souche avec des dilutions encore plus fortes allant jusqu'à 10-9.

L'émulsion précédemment utilisée renferme, nous l'avons vu, trente spores en moyenne au centimètre cube. Elle en

renferme trois à 10^{-8} et 0,3 à 10^{-9} par unité de volume. Ces résultats ont été confirmés et établis au moyen de numérations effectuées de la même manière que ci-dessus en utilisant les 10 centimètres cubes d'une même pipette et en ensemençant 1 centimètre cube de cette pipette par boîte de Pétri.

Numération de l'émulsion à 10^{-9} :

Boîte 1.....	1	colonie: 1 spore
— 2.....	0	—
— 3.....	1	— 1 spore
— 4.....	0	—
— 5.....	0	—
— 6.....	0	—
— 7.....	0	—
— 8.....	1	— 1 spore
— 9.....	0	—
— 10.....	0	—

Dix cobayes ont reçu chacun 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-9} . Sur ces dix cobayes, *deux sont morts* et huit ont survécu. C'est donc dire — et on peut aisément l'admettre devant les données de la numération précédente — que pour le cobaye et pour la souche utilisée dans le cas particulier, la spore est l'unité virulente, la dose minima mortelle.

Muni de ces résultats, nous avons entrepris la numération de la dilution précédente et plus forte, au taux de 10^{-8} .

Nous avons obtenu les indications suivantes :

Boîte 1.....	1	colonie
— 2.....	5	—
— 3.....	2	—
— 4.....	7	—
— 5.....	9	—
— 6.....	2	—
— 7.....	0	—
— 8.....	1	—
— 9.....	1	—
— 10.....	2	—

Chaque colonie correspondant à une spore notre dilution

doit renfermer théoriquement et presque certainement environ trois spores au centimètre cube.

Nous avons inoculé dix cobayes avec ce matériel à raison de 1 centimètre cube par cobaye, par voie sous-cutanée.

Sur ces dix animaux, cinq sont morts avec les lésions caractéristiques du charbon.

Les cinq autres animaux *ont survécu* à l'inoculation sans réactions, ni locale, ni générale. Or il n'est pas exagéré, semble-t-il, de penser que la majorité de ces animaux a reçu au moins trois spores par dose inoculée, soit trois doses minima mortelles, d'après ce que nous avons établi ci-dessus. Il y avait aussi un animal sur dix qui aurait pu ne recevoir aucune spore et survivre. Il n'y aurait alors qu'un seul survivant possible et non pas cinq.

On pourrait objecter en second lieu que 5 cc. de la dilution ont pu absorber à eux seuls tous les éléments virulents. Ce serait un fait ou un hasard tout à fait extraordinaire que l'on ne peut envisager sérieusement, étant donné que l'émulsion a été duement agitée avant l'inoculation.

Il n'y a donc ni erreur de seringue, ni erreur de numération qui puisse expliquer la survie de ces cinq animaux. Nous devons nécessairement conclure pour la troisième fois à une variété dans les réactions individuelles propres à chacun des animaux inoculés.

Et du point de vue pratique nous soulignerons toute l'importance de ce fait.

Il est nécessaire de tenir compte de ces différences notoires dans les réactions individuelles vis-à-vis d'un même virus surtout dans des titrages de ce genre, car elles peuvent avoir dans certains cas une signification intéressante selon le but que l'on recherche et l'emploi auquel on destine le matériel virulent.

Il est évident que pour avoir une certitude dans un titrage ayant pour but de déterminer une dose minima mortelle, sur un animal d'une espèce donnée, il faut obtenir une cer-

taine moyenne de morts dans le nombre d'animaux inoculés avec la souche à contrôler. Nous avons vu dans notre Chapitre II que THEILER, à qui nous avons emprunté la méthode d'obtention d'un matériel sporulé pur et virulent, titre ses émulsions à raison de deux ou trois animaux de même espèce : lapin, cobaye ou mouton pour chaque titre de dilution et ceci pour obvier aux inconvénients des différences de réceptivité et des réactions individuelles. C'est ce qu'il est courant de faire, à l'exemple de THEILER dans tous les cas semblables.

3° INFLUENCE DE LA RACE

Frappé par tant de variations dans les effets de l'infection charbonneuse, qui se rencontrent non seulement dans les différentes espèces, vis-à-vis d'une souche déterminée, nous avons été amené à rechercher s'il était permis d'envisager pour une espèce déterminée une différence de réceptivité pour chaque « race » vis-à-vis d'une souche donnée du charbon bactérien.

C'est à ce dernier problème que nous allons essayer de donner une solution pour clore ce chapitre.

Nos recherches bibliographiques nous ont permis de constater que l'étude de la virulence comparée de la bactériémie charbonneuse, à l'endroit d'animaux de même espèce et de race différente n'a jamais fait, en dehors des travaux déjà anciens de CHAUVÉAU et de LHERITIER, FLEURY et TRIBOUT, de l'Institut Pasteur d'Algérie, l'objet de communications importantes.

Avant d'exposer nos propres recherches et conclusions sur la question, il convient de rappeler succinctement les expériences de ces auteurs.

Les travaux bien connus de CHAUVÉAU avaient démontré il y a longtemps déjà que les moutons algériens étaient résistants à la bactériémie charbonneuse d'origine française.

CHAUVÉAU (100) avait été conduit à constater tout d'abord dans deux expériences préliminaires précises, entreprises au

cours de ses leçons de médecine expérimentale, que certains moutons résistaient à l'inoculation du charbon.

Voici ces expériences :

« Un de ces animaux, dit-il, est inoculé avec du sang charbonneux recueilli sur une vache. Non seulement le mouton ne mourut pas du sang de rate, mais il ne parut pas malade ; tandis que deux lapins inoculés comparativement furent tués en trente-six heures. »

Dans une deuxième expérience il constate :

« Qu'une inoculation charbonneuse dont la matière infectante avait été fournie par une chèvre morte du charbon spontané, avait tué une brebis mérinos en trente-six heures. Un morceau de la rate de cette brebis, morceau extrêmement riche en bâtonnets, est écrasé dans un mortier avec un peu d'eau et fournit un liquide où les agents infectants du charbon sont en grand nombre — dix-huit gouttes de ce liquide sont injectées dans la jugulaire d'un mouton mérinos. Sur un mouton de même race la même quantité est injectée sous la peau de la cuisse gauche ; et l'on fait de plus à la face interne de la cuisse droite six piqûres d'inoculation avec la pointe d'une lancette trempée dans le sang de rate. Le bélier meurt en neuf jours, quant au mouton il résiste. Un abcès qui s'est formé à la face interne de la cuisse gauche dans l'endroit où a eu lieu l'injection sous-cutanée, s'ouvre le dixième jour et donne issue à du pus blanc crèmeux et odorant. L'animal ne tarde pas à se rétablir complètement sans avoir jamais présenté une seule bactériidie dans le sang. »

Poursuivant ses recherches et s'appuyant sur ces faits, en retenant seulement la question de la race de ces animaux, CHAULVEAU constate l'immunité naturelle du mouton algérien au charbon bactériidien : neuf moutons algériens d'origine duement constatée sont inoculés l'un jusqu'à cinq fois consécutives, les autres trois fois. Le matériel infectant a été puisé pour ces inoculations à des sources diverses et les procédés d'inoculation ont été variés. Enfin des témoins constitués par des moutons indigènes (Français) et des lapins qui servaient de sujets de comparaison, succombaient après la première inoculation. Et CHAULVEAU conclut :

« On peut affirmer hautement que les moutons algériens qui ont servi de sujets d'expérience étaient bien doués de l'immunité contre le charbon. »

De plus en plus CHAUVEAU s'attache à cette idée et tend à démontrer l'immunité naturelle du mouton algérien à la fièvre charbonneuse, et, au cours de ses expériences qu'il multiplie, il inocule ses animaux à la lancette par piqure sous-épidermique et sous-dermique, à l'oreille, avec de la matière charbonneuse provenant d'une rate desséchée dont la virulence était extrêmement active.

Ailleurs, c'est de la pulpe fraîche d'une rate de lapin, extrêmement riche en bactériidies charbonneuses, qui sert aux inoculations.

En Algérie (101), où pour plus de certitude CHAUVEAU pratique ses expériences, le matériel virulent est constitué par de la pulpe splénique d'un mouton charbonneux, écrasée entre deux plaques de verre enveloppées dans des feuilles d'étain ; par une culture en tube préparée suivant la méthode de PASTEUR, ou des cultures riches en spores, etc.

Cependant, CHAUVEAU, dans quelques cas, obtient néanmoins la mort du mouton algérien, et dans une de ses conclusions il en expose les raisons :

« Mais il n'en reste pas moins prouvé par l'ensemble de mes expériences que la grande quantité des agents infectants dans les inoculations de sang de rate aux moutons algériens, est une des conditions qui permettent de vaincre la résistance que ces animaux opposent en général au virus charbonneux. »

Enfin, dans une dernière note (102) sur la nature de l'immunité du mouton algérien contre le sang de rate, après avoir démontré que même les jeunes moutons dès leur naissance ne sont pas réceptifs à la bactériдие et prouvé que le milieu algérien n'est pas capable de conférer à des moutons français la même immunité constatée sur les moutons algériens, CHAUVEAU conclut :

« Après cette deuxième expérience (ci-dessus) on ne peut échapper aux conséquences de la première (sur les germes), c'est-à-dire à l'obligation de considérer l'immunité des moutons algériens comme *une propriété de race.* »

Par ces expériences devait naître le dogme que le mouton algérien était réfractaire à la bactériⁱdie charbonneuse. Sans vouloir prétendre aller à l'encontre des conclusions et des expériences du maître que fut CHAUVEAU, — il faudrait pour cela refaire ces expériences dans des conditions rigoureusement identiques et en apprécier les résultats, — on est obligé semble-t-il d'admettre en principe ses expériences dans leur résultat final. Mais il apparaît néanmoins que celles-ci ne soient pas à l'abri de certaines critiques qui paraissent s'en dégager et qui laissent, pourtant, planer quelque doute sur l'absolu de ces expériences et leurs conclusions.

En effet, du point de vue du matériel inoculé, CHAUVEAU tout d'abord n'a jamais utilisé dans toutes ces expériences que du charbon d'origine française, et, en dehors de cette question d'origine de la souche, on peut facilement se rendre compte qu'à part quelques rares expériences, CHAUVEAU ne se servit jamais de cultures pures, mais à chaque fois il utilisa des produits virulents ou des extraits de ces organes.

Or, on sait, et c'est une donnée classique actuellement, que l'association d'impuretés à la bactériⁱdie charbonneuse, *B. pyocyanique* en cultures, ou extraits de tel ou tel autre germe, provoquent chez les animaux inoculés une certaine inhibition à l'action pathogène du charbon, une certaine résistance à l'infection.

Les expériences de FORTINEAU (103), entreprises tant sur les animaux que sur les humains, démontrent que l'inoculation du pyocyanase ou de cultures stérilisées de bacilles pyocyaniques à des cobayes, lapins ou moutons, voire même à des hommes, annihile dans certains cas l'action pathogène du charbon.

FUKUDA (104), reprenant les expériences d'EMMERICK et

LOEW, sur l'action protectrice du B. pyocyanique dans l'infection charbonneuse, constate non pas une survie absolue, mais un certain pouvoir protecteur. Enfin, tout récemment encore, URBAIN a démontré d'une façon péremptoire ce fait bien connu.

De sorte qu'il est permis de penser que les données expérimentales que nous venons d'examiner, se sont peut-être trouvées réalisées accidentellement, lors des inoculations pratiquées par CHAUVEAU qui ne se servit on le sait que d'organes virulents plus ou moins frais. Cela aurait évidemment entraîné une survie des animaux.

Ce fait apparaît en partie dans ses expériences lorsqu'il dit qu'un mouton inoculé sous la peau de la cuisse résiste, mais fait un gros abcès au lieu de l'inoculation. Dans ce cas il y a eu, on peut l'admettre, une infection surajoutée, car jamais les réactions locales charbonneuses n'ont l'apparence décrite.

Une autre raison de résistance des moutons peut également résider dans le fait que seule la bactériémie française leur a été inoculée, et ceci indépendamment de la réceptivité de race qui peut être existante.

Enfin, dans plusieurs expériences, et ce sera notre dernier argument, CHAUVEAU a commencé par inoculer dans le derme des doses peut-être subpathogènes de bactériemies charbonneuses à la lancette, puis quelques jours après, de trois à cinq jours, ses animaux ont reçu une dose certainement mortelle et les animaux ne sont pas morts. N'y a-t-il pas eu dans ce cas apparition d'une immunité rapide, explosive, comme dans la méthode de vaccination intradermique préconisée par VELU, et pratiquée sur une grande échelle actuellement au Maroc. Au cours des essais de cette méthode, chaque fois que des moutons ont reçu du vaccin par voie intradermique puis, au cours de l'incubation, du charbon virulent par voie sous-cutanée, ils ne sont jamais morts. Bien mieux, ils n'ont manifesté aucun trouble morbide si léger soit-il.

De sorte qu'il est permis de se demander, la question de

l'immunité active n'étant à cette époque qu'à peine pressentie, si CHAUVEAU par ses inoculations multiples et successives faits dans l'espoir de vaincre enfin la résistance du mouton algérien, n'a pas tout simplement vacciné et hyperimmunisé ses animaux.

Quoiqu'il soit permis d'en penser, il faut admettre dans le principe les expériences de CHAUVEAU. Mais faut-il en faire exclusivement une question de réceptivité de race comme il l'a fait, ou une question de virulence de la souche utilisée comme l'ont établi plus récemment les expériences de LHERITIER, FLEURY et TRIBOUT (105) de l'Institut Pasteur d'Alger.

Ces auteurs éprouvent la virulence de la bactériémie d'origine ovine algérienne, en la comparant à la virulence de la bactériémie charbonneuse de collection de l'Institut Pasteur de Paris, souches qui sont telles que l'une tue le cobaye en trente-trois heures, l'autre en plus de quarante heures. Des moutons algériens sont inoculés avec des doses identiques rigoureusement (afin d'écarter la question de l'importance de la quantité de virus signalée par CHAUVEAU) de l'une et l'autre souche. Nous savons la valeur qu'il convient d'attribuer à ces titrages.

Les moutons algériens inoculés avec le virus algérien, sont morts avec les signes cliniques caractéristiques, et l'isolement de la bactériémie charbonneuse a été facilement fait. Tandis que des moutons de même race inoculés avec le virus français, aucun n'a succombé ; tout au plus ont-ils manifesté une légère réaction fébrile. En conclusion, ces auteurs affirment :

« Ainsi que l'avait montré CHAUVEAU, les moutons algériens sont réfractaires dans les conditions ordinaires à l'infection par une bactériémie charbonneuse d'origine française... Ces animaux sont vaccinés contre le virus algérien. »

Ainsi ces auteurs ont montré nettement la différence de virulence entre la bactériémie française et la bactériémie algérienne, dans ses effets sur le mouton algérien.

Nous avons repris les mêmes expériences avec la bactériémie marocaine et la bactériémie française, pour voir laquelle de ces

deux souches avait les propriétés plus actives, la virulence la plus grande. C'est le corollaire des expériences de LHERITIER, FLEURY et TRIBOUT que nous avons tenté d'établir, afin de nous rendre compte nous même s'il faut considérer cette résistance du mouton algérien, et plus spécialement marocain, comme une vérité absolue ou relative, ou envisager ici une question de race.

Nous avons tout d'abord essayé d'établir pour le mouton marocain la D.M.M. d'un certain nombre de souches, à savoir :

F¹ — N° 19 — N° 6 — N° 36.

Ce sont, on le voit, les mêmes souches dont nous avons déterminé pour chacune les doses minima mortelles pour le lapin, dans un groupe d'expériences précédent. Elles ont été utilisées sous forme d'émulsions sporulées comme précédemment.

Protocole — Ces souches sont inoculées à des moutons marocains bien homogènes de 30 kilogr. chacun, du même âge, et par conséquent susceptibles de fournir les mêmes réactions à la même dose de virus inoculé.

Les D.M.M. pour chaque souche utilisée sur le mouton marocain ont été établies par inoculation de plusieurs animaux. Nous allons en donner succinctement les résultats obtenus.

4° TITRAGE DES SOUCHES VIRULENTES SUR LE MOUTON

1° Moutons marocains.

Souche F¹. — La dose mortelle minima était pour le lapin de 1 centimètre cube de la solution mère.

Deux moutons de race indigène ont été inoculés :

Mouton 321. — Cet animal reçoit 10 centimètres cubes de solution mère par voie sous-cutanée dans la région abdominale, le 6 octobre 1931.

Il n'a manifesté qu'une légère réaction thermique. L'hyperthermie maxima notée le lendemain de l'inoculation a atteint 40°2 pour retomber ensuite à 39°2, température de départ, et osciller aux

environs de cette température pendant les jours qui suivirent, jusqu'à la fin de l'observation, soit le 31 octobre.

La réaction peut donc être considérée comme nulle en ce qui concerne cet animal.

Mouton 322. — Reçoit le même jour 50 centimètres cubes d'émulsion mère au même lieu et par la même voie.

La réaction de cet animal s'est limitée à une forte hyperthermie enregistrée le lendemain et le surlendemain de l'inoculation, avec quelques légers signes morbides. La température de départ, 39°5, a atteint 41°, puis 41°2 pour redescendre progressivement aux environs de 39°, au cours de l'observation, qui a duré autant que pour le cas précédent, soit vingt-six jours.

Ici encore nous n'avons point obtenu de résultat positif quant à l'établissement d'une dose minima mortelle de la souche F¹, souche française de collection vis-à-vis du mouton marocain.

Mais d'un autre point de vue ce résultat s'est montré d'un grand intérêt pour nous et nous laissait envisager combien le mouton marocain était résistant vis-à-vis de la bactériémie d'origine française, puisqu'il ne succombe pas au nombre formidable d'unités virulentes inoculées(au mouton 322), soit 8.250 millions de spores, dose qui n'a provoqué chez cet animal qu'une réaction fébrile, passagère, sans réaction locale. Nous savons en effet par nos titrages précédemment faits sur le lapin que 1 centimètre cube de l'émulsion mère de cette souche contient 165.000.000 de germes.

Souche 6. — Cette souche est mortelle pour le lapin à la dose de 1 centimètre cube de la dilution à 10-3, soit 95.000 germes environ.

Cinq animaux sont inoculés avec des quantités égales de dilutions de plus en plus denses.

Mouton 323. — Reçoit, le 6 octobre 1931, 1 centimètre cube de dilution à 10-1 par voie sous-cutanée abdominale, dose représentant 9 millions 5 d'unités virulentes (spores).

Mouton 329. — Reçoit, le 10 octobre 1931, la même dose de la même dilution, par la même voie, au même lieu.

Mouton 328. — Inoculé le 12 octobre 1931, avec 1 centimètre cube de l'émulsion mère dans les mêmes conditions.

Mouton 331. — Reçoit 10 centimètres cubes d'émulsion mère, soit 950.000.000 de germes, en respectant toujours les mêmes conditions expérimentales.

Mouton 341. — Reçoit 50 centimètres cubes de l'émulsion mère, soit 4.750.000.000 de germes, par la même voie.

Toutes ces inoculations nous ont fourni des résultats à peu près identiques dans l'ensemble. Les réactions de chaque individu, sans distinction de doses, ont été uniquement thermiques et passagères.

Le sujet 323 a manifesté une hyperthermie assez élevée dans les quarante-huit heures consécutives à l'inoculation (41°4) qui diminua rapidement.

Le sujet 329 réagit dans le même sens. Il a manifesté une forte hyperthermie (de 39°2 à 41°8) à maximum enregistré le troisième jour. Puis progressivement la température s'est fixée au degré normal sans subir ensuite aucune perturbation.

Le mouton 328 a manifesté les mêmes symptômes.

La réaction des sujets 331 et 341, qui pourtant ont été inoculés avec des doses déjà considérables de virus, n'a pas varié dans son aspect général. Elle s'est traduite par une forte hyperthermie, quelques troubles généraux qui ont rapidement regressé, à la suite desquels les animaux ont semblé avoir recouvré toute leur santé.

Ici encore, en résumé, nous nous sommes trouvé dans l'impossibilité d'établir une dose minima mortelle rigoureusement titrée : la souche 6, souche marocaine de collection (1923) possède une virulence très atténuée, à peu près semblable à celle de la souche française de même nature.

Souche 19. — La dose minima mortelle de cette émulsion pour le lapin est de 1 centimètre cube de dilution au 10-4 soit environ 8.500 spores.

Sur le mouton cette souche s'est révélée plus virulente que les précédentes et nous avons pu établir cette fois une dose mortelle duement titrée.

Plusieurs animaux sont inoculés avec des taux différents de l'émulsion mère.

Mouton 324. — Inoculé le 6 octobre 1931 avec 1 centimètre cube de dilution à 10^{-2} par voie sous-cutanée abdominale. Cet animal a présenté une forte hyperthermie le 8 octobre 1931 ($41^{\circ}8$).

Le 11, l'animal, dont l'état morbide était des plus inquiétant, est mort.

A l'autopsie nous avons pu noter une hypertrophie considérable de la rate qui avait l'aspect caractéristique de boue noirâtre à la section, et en outre, des lésions septicémiques généralisées considérables apparaissant sur tous les viscères.

Les frottis nous ont permis de déceler de nombreuses bactériidies dans le foie, plus rares dans la rate. Les hémocultures (sang du cœur) ont été positives.

Mouton 326. — Reçoit, le 10 octobre 1931, 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-3} dans les mêmes conditions. Il est mort le 14 avec les mêmes lésions caractéristiques relevées dans le cas précédent.

Mouton 322. — Inoculé le 19 octobre 1931 avec la même dose, de la même dilution. L'animal meurt le 22 octobre 1931, après avoir manifesté les mêmes troubles, et, à l'autopsie, nous avons pu relever des lésions exactement semblables et aussi importantes.

Enfin, deux autres animaux ont été inoculés avec une dilution encore moins dense, au taux de 10^{-4} .

Mouton 330. — Reçoit, le 14 octobre, 1 centimètre cube de dilution à 10^{-4} . Une simple réaction thermique très légère est enregistrée. Aucun signe morbide important n'est noté au cours de l'observation qui dure seize jours. L'animal résiste.

Mouton 333. — Reçoit le 19 octobre la même dose de la même dilution. Nous n'avons noté ici qu'une hyperthermie subite mais regressant progressivement (41° les 21 et 22 octobre 1931, $41,4$ le 26) jusqu'à redevenir normale.

De ces inoculations il résulte que la dose minima mortelle de la souche 19 pour le mouton, est de 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-3} , ce qui représente environ 85.000 spores,

d'après les numérations que nous avons faites de cette souche dans le chapitre précédent. En outre cette dose semble due-ment établie puisque nous avons obtenu deux fois la mort sur deux animaux inoculés, alors que deux autres sujets inoculés avec une dilution moins dense ont parfaitement résisté.

Notre dernier titrage a porté sur une souche de charbon marocain, récemment isolée, provenant d'un cas de charbon du bœuf.

Souche 36. — Cette souche est mortelle pour le lapin au taux de 10^{-4} de l'émulsion mère, soit 9.750 spores environ.

Mouton 325. — Inoculé le 6 octobre 1931 avec 1 centimètre cube de dilution à 10^{-2} , toujours par la même voie.

Mouton 334. — Reçoit dans les mêmes conditions, le 19 octobre 1931, 1 centimètre cube de dilution à 10^{-3} .

Mouton 342. — Reçoit le même matériel à la même dose, par la même voie.

Mouton 327. — Inoculé dans les mêmes conditions.

Mouton 339. — Reçoit, le 5 octobre 1931, 1 centimètre cube de dilution à 10^{-4} .

L'ensemble des réactions enregistrées nous a permis de fixer le taux de 10^{-3} comme dose minima mortelle.

Le sujet 325 est mort en deux jours au cours de l'ascension thermique qui a atteint 42° , par conséquent très rapidement.

Les sujets 334 et 342 sont morts également l'un en quatre jours, l'autre en huit jours, en cours d'hyperthermie forte.

L'autopsie nous permet de constater sur l'un et l'autre de ces animaux des lésions de septicémie foudroyante. La rate est très hypertrophiée et diffluyente. Les frottis de rate et de foie nous permirent de constater un envahissement considérable de ces organes par les bactériidies, très nombreuses.

Quant au sujet 327 qui aurait dû normalement mourir, il n'a manifesté qu'une réaction thermique très forte, mais pas-

sagère. Il a néanmoins *résisté* à l'infection. Nous reviendrons un peu plus loin sur ce cas.

Le sujet 339 n'a manifesté qu'une légère hyperthermie avec en outre des signes morbides relativement bénins. Il résiste également.

Nous avons donc considéré comme D.M.M. la dose de 1 centimètre cube de dilution à 10-3, soit environ 97.500 spores.

Pour ce titrage dont les conclusions s'imposent, nous pouvons constater que plusieurs hypothèses se trouvent vérifiées.

La première donnée que l'on peut en déduire consiste dans *la résistance duement démontrée du mouton marocain à la bactériémie d'origine française*. Les inoculations expérimentales précédentes prouvent suffisamment ce fait et confirment en partie du moins les expériences de CHAUVÉAU relatées ci-dessus. Nous ne pouvons pas encore dire s'il faut envisager ici une question de race, mais il apparaît nettement que dans la notion de virulence, il faut faire nécessairement entrer un facteur qui joue un rôle important : l'origine de la souche et sa nature.

Nous pouvons en outre voir par comparaison de souches entre elles, dans leurs effets surtout, que deux souches de collection indépendamment de la question d'origine, sont relativement comparables du point de vue de leur virulence. Le pouvoir pathogène de F¹ souche française et de la souche 6, souche marocaine, est sensiblement égal vis-à-vis du mouton marocain : ni l'une, ni l'autre n'ont fait mourir cet animal. Les souches récemment isolées sont extrêmement virulentes (Souche 36).

Enfin nous trouvons vérifiée une fois encore la notion de *variation des réactions individuelles* vis-à-vis d'une même souche utilisée à des doses identiques.

Un de nos animaux (mouton 327) a résisté, nous l'avons vu à l'inoculation virulente qui a fait succomber deux sujets semblables à lui en tous points. Cet exemple semble parler en

faveur de l'hypothèse ci-dessus énoncée, dont nous avons souligné l'importance au cours du chapitre précédent.

2° Titrage sur des moutons européens.

Envisageant ensuite la dernière partie du problème que nous nous étions proposé, à savoir si la résistance du mouton marocain à la bactériémie d'origine française, doit être imputée à une réceptivité particulière à la race, nous avons poursuivi nos inoculations de titrage sur des moutons européens. Les animaux qui nous ont servi étaient des moutons croisés Rambouillet-Crau, importés depuis quelques années au Maroc et que nous avons choisi autant qu'il nous a été possible, semblables aux moutons marocains précédemment utilisés. Les souches employées à ce titrage ont été les mêmes souches : 6, 19, 36, bien connues dans leurs effets vis-à-vis du lapin et dûment numérees.

Nous n'avons pu, faute de sujets, expérimenter la souche F¹, souche française, sur le mouton français. Il était d'ailleurs surtout nécessaire pour nos conclusions de savoir comment, en présence des résultats acquis sur le mouton marocain, se comporteraient les moutons français vis-à-vis du même virus marocain.

Voici succinctement exposés ces résultats :

Souche 6.

Mouton 338. — Reçoit 1 centimètre cube de dilution à 10⁻¹ de l'émulsion mère sporulée, par voie sous-cutanée. Nous n'avons enregistré qu'une forte réaction thermique et générale qui s'éteignit progressivement en huit jours.

Mouton 340. — Inoculé le 10 novembre 1931 avec 0 cc. 5 de l'émulsion mère en sérum glyciné. Nous avons inoculé ici une dose relativement faible comparativement à celle utilisée pour le mouton marocain, nous réservant la possibilité d'augmenter cette dose si elle se montrait insuffisante pour provoquer la mort. C'est ce qui se produisit. L'animal a manifesté une très forte réaction qui a surtout consisté en une hyperthermie prolongée et irrégulière à maxima nombreux. Après six jours, la température a baissé progres-

sivement jusqu'au moment où l'observation a pris fin, l'animal étant considéré comme hors de danger.

Mouton 346. — Reçoit, le 18 novembre, deux centimètres cubes de l'émulsion mère au même lieu par la même voie.

L'animal meurt le 22 novembre après une forte réaction thermique. Il a présenté à l'autopsie toutes les lésions macroscopiques caractéristiques de l'infection charbonneuse, contrôlée par des préparations colorées et des hémocultures qui furent positives.

Nous avons considéré cette dose comme la dose mortelle pour le mouton français, soit environ 190.000.000 de spores.

Souche 19.

Mouton 335. — Reçoit, le 27 octobre 1931, 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-5} . L'animal résiste après une forte hyperthermie consécutive à l'inoculation.

Mouton 336. — Reçoit la même dose, le même jour, par la même voie. Cet animal meurt le 1^{er} novembre. Les lésions, à l'autopsie, sont caractéristiques : signes de septicémie généralisée, œdème gélatiniforme au point d'inoculation ; les frottis de rate et de foie furent positifs. Bactéridies très nombreuses.

Mouton 320. — Reçoit la même dose. Il meurt en quatre jours avec les mêmes lésions.

Pour cette souche, la D.M.M. mortelle est donc de 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-5} , soit environ 850 spores.

Souche 36.

Mouton 343. — Inoculé, le 17 novembre 1931, avec 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-3} . Réaction positive, forte hyperthermie et mort le 21 avec signes positifs.

Mouton 347. — Reçoit, le 18 novembre 1931, 1 centimètre cube de la dilution à 10^{-4} . Il meurt le 21 avec lésions, frottis et hémocultures positives.

Mouton 337. — Reçoit la même dose, mais se rétablit après avoir manifesté des signes morbides inquiétants et une forte hyperthermie. Il résiste néanmoins.

La dose minima mortelle que nous avons fixée est donc ici de 1 centimètre cube de dilution à 10^{-4} , soit 975.000 spores.

Ce sont là les résultats que toutes nos inoculations nous ont permis de constater. Avant de les commenter et de les comparer entre eux, nous les avons groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU IV

Taux de dilution	Souche F ¹	Souche 6	Souche 19	Souche 36
Emuls. mère				
50 cc.	Mouton marocain a survécu	.		
10 cc.	Mouton marocain a survécu	..		
50 cc.	»	Mouton marocain a survécu. Réaction légère.		
2 cc.	»	Mouton européen mort en 4 jours.		
0 cc. 50	»	Mouton européen très forte réaction.		
Dilution 10. ⁻²	»	»	Mouton marocain mort	
— 10. ⁻³	»	»	2 moutons marocains morts.	
— 10. ⁻⁴	»	»	2 moutons marocains ont survécu.	
— 10. ⁻⁵	»	»	2 moutons français morts, 1 a survécu après très forte réaction.	
— 10. ⁻²	»	»	»	Mouton marocain mort.
— 10. ⁻³	»	»	»	Mouton marocain mort.
— 10. ⁻⁴	»	»	»	1 mouton marocain a survécu après forte réaction.
— 10. ⁻³	»	»	»	1 mouton marocain mort.
— 10. ⁻⁴	»	»	»	1 mouton français mort
— 10. ⁻⁴	»	»	»	Mouton marocain a survécu
				Mouton français mort en 3 jours.
				1 mouton français a survécu.

Les données expérimentales précédentes et le tableau qui les résume, nous permettent de conclure à l'existence d'une réceptivité de race. Non seulement les ovins marocains sont résistants à de très fortes inoculations de virus français (bactéridie de collection de l'Institut Pasteur de Paris), mais ils montrent encore une résistance beaucoup plus grande que le mouton français à la bactéridie que l'on rencontre dans le milieu où ils vivent, à la souche marocaine.

Alors que le mouton marocain a survécu à l'inoculation de 50 centimètres cubes de l'émulsion mère en sérum glyciné de la souche 6, soit 4.750.000.000 de spores virulentes, après n'avoir présenté qu'une légère réaction, le mouton français a succombé en quatre jours à l'inoculation de 2 centimètres cubes d'émulsion mère de cette même souche soit 190.000.000 de spores seulement, dose vingt-cinq fois moindre.

En ce qui concerne la souche 19, les résultats ne sont pas moins démonstratifs pour ce qui est du point de vue particulier qui nous occupe.

Le mouton marocain succombe facilement à l'inoculation de 1 centimètre cube de dilution à 10-3, soit 85.000 spores environ. Le mouton français est mort de septicémie charbonneuse, avec une dose cent fois moindre de la même souche, soit 1 centimètre cube de dilution à 10-5, ce qui représente 850 spores seulement. Une dose dix fois plus forte (10-4) n'a point provoqué la mort du mouton marocain.

Ces données sont excessivement démonstratives et d'autant plus nettes qu'elles ont été acquises en utilisant des souches relativement peu virulentes puisqu'elles sont conservées depuis 1923 en collection.

Les expériences faites avec la souche 36 beaucoup plus virulente et récemment isolée sont également concluantes. Etant donné la virulence de la souche, il était possible en effet que la différence de son action sur le mouton marocain et le mouton français ne soit nullement apparente ou presque.

Elle s'est cependant manifestée, mais dans des limites plus réduites.

Le mouton marocain meurt de charbon avec 1 centimètre cube de dilution à 10^{-3} , soit 97.500 germes, inoculés sous la peau.

A cette même dose le mouton français succombe. L'inoculation avec 1 centimètre cube de dilution à 10^{-4} provoque encore la mort. C'est la dose minima mortelle que nous avons retenue pour cette souche et qui représente 9.750 spores environ, soit une dose *dix fois moindre* que celle utilisée pour le mouton marocain.

Les tableaux suivants groupent les résultats acquis :

TABEAU V

Doses mortelles chez les moutons inoculés

I. — MOUTONS MAROCAINS

Par cc. de dilution	Souche F ¹	Souche 6	Souche 19	Souche 36
Emuls. mère :				
50 cc.	Plus de 8.250 millions de spores. L'animal résiste à cette dose.			
50 cc.	»	Plus de 4.750.000.000 de spores : résiste.		
1 cc. 10^{-3}	»	»	85.000 spores	
1 cc. 10^{-3}	»	»	»	97.500 spores

TABLEAU VI

II. — MOUTONS FRANÇAIS

Par cc. de dilution	Souche F ¹	Souche 6	Souche 19	Souche 36
Emuls. mère :				
2 cc.	»	190.000.000 de spores.		
1 cc. 10. ⁻⁵	»	»	850 spores.	
1 cc. 10. ⁻⁴	»	»	»	9.750 spores.

Enfin nous envisagerons un autre facteur qui semble être en faveur de l'hypothèse énoncée ci-dessus. Les moutons français ont non seulement succombé à des doses moindres de virus que celles utilisées pour les moutons marocains, résultats condensés dans les tableaux précédents, mais ils sont morts, dans un laps de temps plus court que celui que nous avons pu constater chaque fois que la mort a été la conséquence de l'inoculation chez les moutons marocains et pour des souches correspondantes.

CONCLUSIONS. — Les résultats de l'expérimentation précédente qui a été conduite avec le plus grand soin, nous obligent de conclure à l'existence chez les ovins d'une réceptivité au charbon bactérien variable avec la race ; certaines races ovines nord-africaines et particulièrement le mouton marocain montrent une résistance particulière à l'infection charbonneuse.

CHAUVEAU, tout d'abord, FLEURY, LHERITIER et TRIBOUT ensuite, avaient démontré ces faits. Nos expériences viennent corroborer les résultats qu'ils avaient acquis dans ce sens.

Relative vis-à-vis de la souche d'origine marocaine, cette résistance des moutons marocains est absolue vis-à-vis de la bactérie française.

Toutes nos expériences parlent en faveur de cette hypothèse et la démontrent avec autant de précision qu'il est possible de donner à une expérimentation de ce genre, au cours de laquelle on est parfois gêné dans les titrages du matériel virulent que l'on veut utiliser, par les réactions individuelles qui varient d'un sujet à l'autre à l'égard d'une même souche et qui se rencontrent fréquemment. Nous avons souligné ailleurs toute l'importance de ces faits.

Sans avoir épuisé la question, nous croyons avoir envisagé ce dernier problème à tous ses points de vue particuliers.

Nous avons étudié les variations de la virulence en considérant et en étudiant dans le détail ses facteurs principaux. le germe lui-même et l'individu réceptif.

D'un point de vue plus étendu nous pouvons faire servir nos expériences aux conclusions de CHAUVEAU sur les causes possibles de cette résistance particulière du mouton nord-africain.

Dans ses recherches au sujet de ces causes, CHAUVEAU avait envisagé le milieu comme un facteur susceptible d'attribuer par son influence cette propriété biologique à ces animaux.

Nous pouvons voir que le milieu ne joue aucun rôle ici puisque les moutons français que nous avons utilisés sont nés et ont été élevés dans le milieu incriminé et qu'ils ne se sont pas montrés pour cela aussi résistants que les moutons marocains aux mêmes inoculations.

Il faut donc faire nécessairement de cette propriété particulière une propriété de race.

En résumé, dans ce chapitre nous nous sommes attaché à rechercher avec précision tous les facteurs susceptibles de faire varier la virulence d'un germe déterminé.

A toute injection, il y a des réactions « *spécifiques* », *individuelles*, *ethniques* enfin, dont il faut tenir compte dans une expérimentation que l'on veut rigoureuse.

Tout au long de ce travail, nous avons démontré l'existence de ces facteurs, du moins en ce qui concerne l'infection charbonneuse.

Nous y sommes parvenu en utilisant un matériel que nous avons longuement décrit ailleurs, stable et numérable à volonté, titrable facilement, d'une utilisation commode, permettant d'approcher le plus possible de l'exactitude du point de vue des doses injectées.

C'est, du moins à l'égard de l'infection charbonneuse, le matériel idéal susceptible de se plier aux exigences spécifiques, ethniques et individuelles, conditions qui sont appelées à jouer un rôle important dès que l'on parle de virulence, qui sont étroitement liées à ce mot, et qu'il faut considérer chaque fois que l'on tente le titrage d'un matériel d'immunisation active si l'on veut se mettre à l'abri de sérieux mécomptes parfois préjudiciables à l'extrême.

Le vaccin sporulé, dans le cas de l'immunisation anticharbonneuse, est un matériel dont l'élaboration permet de s'entourer de toutes les précautions nécessaires et de satisfaire aux exigences de chacun des facteurs envisagés ; sa constitution même permet de l'adapter de façon rigoureuse, au point de vue virulence stricte, aux organismes différents auxquels il est destiné : il semble seul susceptible de donner à cette opération les garanties nécessaires.

CONCLUSIONS

I. — Dans un premier chapitre nous avons rassemblé les opinions des différents expérimentateurs sur la virulence de la bactériémie, sur les modes variés de préparations du matériel virulent, d'inoculation, et nous avons insisté sur les déficiences des techniques employées.

II. — Dans le chapitre II, nous avons précisé une technique de préparation, de titrage et de conservation d'un matériel sporulé, virulent et stable. Nous avons choisi comme milieu sporogène optimum la gélose au bouillon Liebig sans peptone, de pH 7,4 à 12 p. 1.000 de NaCl, et nous avons établi avec le plus de soin possible la quantité optima de tous les éléments entrant dans la préparation de ce milieu. Nous avons indiqué la nécessité de récolter ces spores ainsi obtenues dans du sérum physiologique glycérimé à raison de deux parties de glycérine en poids pour une de sérum ; et de leur faire subir un séjour de vingt jours à 37°, afin de débarrasser les spores de tout élément mycélien ou étranger, non sporulé. Par des expériences précises, nous avons démontré le rôle bactéricide de la glycérine. Enfin après avoir indiqué une méthode de titrage, nous avons démontré expérimentalement *la nécessité de conserver ce matériel sporulé dûment titré à la température de 0° et surtout à l'abri de la lumière*. Ce matériel reste identique à lui-même et stable, si ces conditions sont respectées. Il est susceptible d'être longtemps conservé ainsi.

III. — Avec ce matériel ainsi préparé nous avons pu entreprendre (Chapitre III) l'étude de la virulence de *bacillus anthracis* que nous avons considéré non pas seulement en fonc-

tion du germe et de l'organisme infecté, mais comme le résultat du conflit entre le microbe envahisseur et l'organisme réceptif envahi.

Nous avons précisé l'action pathogène d'un microbe déterminé qualitativement et quantitativement pris en lui-même, et en fonction d'une espèce donnée, ce qui nous a permis de démontrer :

1° *Que toutes les souches charbonneuses récemment isolées sont comparables ;*

2° *Que les souches de collection sont moins virulentes ;*

3° Que par conséquent, lorsqu'on parle de virulence, il convient de préciser outre le germe, l'origine de ce germe, la souche et le nombre de passages effectués, la durée de conservation au laboratoire.

IV. — Enfin, dans le chapitre IV, nous avons rappelé l'importance des facteurs, spécifique, individuel, et étudié la virulence en fonction de la race, qu'il s'agisse de bactériodie charbonneuse naturelle, ou atténuée.

Nous avons souligné l'utilité et l'avantage d'un matériel sporulé, facilement titrable et surtout stable, facilement utilisable pour les inoculations d'épreuve des animaux vaccinés, point capital en vue de l'obtention d'un vaccin efficace et bien au point, ne présentant aucun danger pour les diverses espèces susceptibles de le recevoir.

Vu : LE DOYEN :

Vu : LE PRÉSIDENT DE THÈSE :

BALTHAZARD.

LEMIERRE.

Vu et permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS :

S. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

1. RIVALIER. — Recherches expérimentales sur l'infection et l'immunisation par la voie cutanée, p. 34. (*Arnette*, Paris, 1924.)
2. BESREDKA. — Immunisation locale. (*Masson*, Paris, 1925.)
3. TOUSSAINT. — Recherches expérimentales sur la maladie charbonneuse. (*Asselin*, Paris, 1879, passim.)
4. TOUSSAINT. — Procédé de vaccination contre le charbon. (*C. R. Acad. des Sciences*, t. LXXXI, 1880, p. 135.)
5. BESREDKA et Y. DE TRÉVISE. — De la vaccination du cobaye contre le sang charbonneux. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. xxxvi, p. 652, juillet 1922.)
6. EICHHORN. — Expériences de vaccination contre le charbon. (*Bull. Inst. Pasteur*, p. 674, 1916.)
7. COMBIESCO. — Recherches sur le mécanisme de l'infection charbonneuse. (*C. R. Société de Biol.*, p. 657 ; séances des 3 mai, 7 juin, 5 juillet 1923.)
8. GRATIA. — Infection charbonneuse et immunité anticharbonneuse obtenue par voie sanguine. (*C. R. Soc. Biol.*, t. xci, mai 1924, p. 114.)
9. RIVALIER. — Recherches expérimentales sur l'infection et l'immunisation charbonneuse par la voie cutanée. (*Arnette*, Paris, 1924.)
10. HRUSKA. — Recherches expérimentales sur le charbon. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XL, août 1926, p. 710.)
11. URBAIN et ROSSI. — Vaccination du cobaye contre le charbon par le liquide d'œdème. (*C. R. Soc. Biol.*, juil. 1926, pp. 544-545.)
12. RIVALIER. — Recherches expérimentales sur l'infection et l'immunisation par la voie cutanée. (*Arnette*, Paris, 1924.)
13. F. DITTHORN. — Des inoculations charbonneuse chez la grenouille. (*Bull. Inst. Pasteur*, 1906, p. 966.)
14. L. TRINCAS. — *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1908, p. 531.
15. HRUSKA. — Recherches expérimentales sur le charbon. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XL, août 1926, p. 710.)
16. BOQUET. — Sur le mécanisme de l'infection charbonneuse. (*C. R. Soc. Biol.*, 8 décembre 1928, p. 1773.)

17. J. DE CHRISTMAS. — Immunisation de rats blancs contre le charbon par cultures avirulentes. (*Bull. Inst. Pasteur*, 1903, p. 627.)
18. URBAIN et ROSSI. — Vaccination du cobaye contre le charbon par le liquide d'œdème. (*C. R. Soc. Biol.*, juil. 1926, p. 544-545.)
19. GIUSTI. — Immunité naturelle du renard et propriétés de son sérum. (*Bull. Inst. Pasteur*, t. III, 1905, p. 650.)
20. J. D'AGATA. — Sur la vaccination anticharbonneuse par des bacilles très virulents mélangés dans le bouillon de culture de bacilles pyocyaniques. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIV, N° 4, 1910.)
21. EICHHORN. — Expériences de vaccination contre le charbon. (*Bull. Inst. Pasteur*, 1916, p. 674.)
22. BALTEANO. — Sur la cuti-infection charbonneuse chez le lapin et le cobaye. (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXVII, juil. 1922, p. 653.)
23. CRIMI. — Sur la valeur préventive et curative du sérum de cobaye fortement immunisé contre la bactériémie charbonneuse. (*Bull. Inst. Pasteur*, t. XXI, N° 12, juin 1923, p. 479.)
24. GRATIA. — Variation microbienne et infection charbonneuse. (*C. R. Soc. Biol.*, janvier 1924, p. 369.)
25. BROCO-ROUSSEU et URBAIN. — Vaccination contre le charbon par la voie cutanée chez le cheval. (*C. R. Soc. Biol.*, 21 juillet 1923, p. 487.)
26. BROCO-ROUSSEU et URBAIN. — Sur la cuti-immunité due à la cuti-vaccination anticharbonneuse chez le cobaye. (*C. R. Soc. Biol.*, 17 mai 1924, p. 137.)
27. RIVALIER. — Recherches expérimentales sur l'infection et l'immunisation par la voie cutanée. (*Arnette*, Paris, 1924.) ●
28. G. CORDIER. — Essais de cutivaccination contre la fièvre charbonneuse. (*C. R. Soc. Biol.*, avril 1925, t. XCH, p. 1309.)
29. L. ROSSI. — De la cutivaccination du cobaye contre le charbon par le premier vaccin seul. (*C. R. Soc. Biol.*, t. cv, 1926, p. 1138.)
30. HRUSKA. — Recherches expérimentales sur le charbon. (*Ann. Inst. Pasteur*, t. XL, août 1926, p. 710.)
31. — URBAIN et ROSSI. — Vaccination du cobaye contre le charbon par le liquide d'œdème. (*C. R. Soc. Biol.*, 17 juillet 1926, p. 544-545.)
32. BALTEANO. — Sur la cuti-infection charbonneuse chez le cobaye et le lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXVII, p. 654, juillet 1922.)
33. BROCO-ROUSSEU et URBAIN. — Vaccination contre le charbon par la voie cutanée chez le cheval. (*C. R. Soc. Biol.*, séance du 21 juillet 1923, p. 487.)
34. STAUB et FORGEOT. — Production rapide d'un sérum anticharbonneux vis-à-vis du cobaye. (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIV, 23 avril 1921.)
35. A. BOQUET. — Sur la réceptivité du cobaye et de la souris au charbon. (*C. R. Soc. Biol.*, t. xc, avril 1923, p. 911.)

36. — A. BOQUET. — Sur l'infection charbonneuse du cobaye par inoculation sous muqueuse de bactérie. (*C. R. Soc. Biol.*, t. xc, janvier 1924, p. 72.)
37. BROCC-ROUSSEU et URBAIN. — Cutivaccination et cutiimmunisation anti-charbonneuse chez le cheval. (*C. R. Soc. Biol.*, 2 juin 1923, p. 20.)
38. BROCC-ROUSSEU et URBAIN. — De la réceptivité pulmonaire à l'infection charbonneuse chez le cobaye et le lapin. — (*C. R. Soc. Biol.*, 12 janvier 1924, N° 90, p. 45.)
39. CORDIER. — Essais de cutivaccination contre la fièvre charbonneuse. (*C. R. Soc. Biol.*, 27 avril 1925, t. xci, p. 1309.)
40. ROSSI. — De la cutivaccination du cobaye contre le charbon par le premier vaccin seul. (*C. R. Soc. Biol.*, t. xcvi, 1926, p. 1138.)
41. FORGEOT. — Vaccination intradermique contre le charbon bactérien. (*Bull. Soc. Path. Exot.*, t. xx, 1927, p. 208.)
42. COMBIESCO. — Vaccination anticharbonneuse chez le lapin. (*C. R. Soc. Biol.*, 23 juin 1927, p. 1735.)
43. V. SCHOCFFER. — Sur l'infection charbonneuse du cobaye par la voie péritonéale. (*C. R. Soc. Biol.*, t. xcvi, 1928, p. 1181.)
44. SOBERNHEIM. — Le sérum anticharbonneux et ses applications pratiques. (*Bull. Inst. Pasteur*, t. ii, 1904, p. 974.)
45. CARINI. — L'emploi du sérum anticharbonneux dans la pratique vétérinaire. (*Bull. Inst. Pasteur*, t. iii, 1905, p. 306.)
46. DONNA. — Recherches sur l'immunisation au moyen du bacille tuberculeux et de *bacillus anthracis* atténués par la lumière solaire. (*Bull. Inst. Pasteur*, 1907, p. 185.)
47. DAWSON. — Indications particulières sur l'obtention de l'immunité charbonneuse. (*Bureau of Animal Industry*, Bull. 137, 12 juin 1911; *Bull. Inst. Pasteur*, 1912, p. 82.)
48. HUTYRA et MANNINGER. — Action du sérum normal dans l'infection charbonneuse. (*Bull. Inst. Pasteur*, t. lxxxiii, p. 518.)
49. NEVODOFF. — Cutivaccination anticharbonneuse en un temps chez le cheval. (*C. R. Soc. Biol.*, t. ii, juin 1926, p. 155.)
50. SOÏTUZ. — Etude sur la sérovaccination anticharbonneuse intradermique chez le cheval. (*Bull. Inst. Pasteur*, t. xxiv, N° 8, 1926, p. 376.)
51. LÉON MULLER. — De l'influence de la température sur l'évolution de l'infection charbonneuse. (*C. R. Soc. Biol.*, 31 juillet 1926, t. xcvi, p. 861.)
52. STERN et KOLPIKOW. — Influence de l'infection charbonneuse sur le fonctionnement des barrières hémato-encéphalique et placentaire. (*C. R. Soc. Biol.*, 20 octobre 1928, p. 1191, t. i.)

53. ROVIDA et SCHWARTZ. — Ricerche sperimentale sulla infezione carbonchiosa. Tentativi di immunizzazione locale cutanea con filtrati di brodo colture. (*Bull. Ins. Pasteur*, t. xxvi, N° 23, décembre 1929, p. 1055.)
54. BESREDKA. — Vaccination contre le Charbon par voie cutanée (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIII, 1920, p. 769.)
55. — — — — — Immunité générale par immunisation locale (*Bull. Inst. Pasteur*, N° 12, t. xx, 1922.)
56. — — — — — Immunisation locale (MASSON et C^{ie}, 1925, Paris.)
57. — — — — — Immunisation locale (MASSON et C^{ie}, Paris, 1925, pp. 39 à 51.)
58. BACHMAN, BELTRAMI, DE ROMAT. — Voies d'infection pour le charbon expérimental (*C. R. Soc. Biol.* 1923, p. 1122.)
59. COMBIESCO. — Recherches sur le mécanisme de l'infection charbonneuse.
60. BASSET. — Réceptivité du cobaye et du lapin au virus du charbon (*C. R. Soc. Biol.*, t. xch, 1925, p. 1513.)
61. — — — — — Pouvoir pathogène des spores pures de la bactériidie de Davaine (*C. R. Soc. Biol.*, t. xch, 1925, p. 1515.)
62. BACHMAN, BELTRAMI, ROMAT. — Voies d'infection pour le charbon expérimental (*C. R. Soc. Biol.* 1923, p. 1122.)
63. RIVALIER. — Recherches expérimentales sur l'infection et l'immunisation par la voie cutanée (ARNETTE, Paris, 1924.)
64. NOCARD et LECLAINCHE. — Sur l'atténuation de la virulence de *B. anthracis*, sous l'influence de substances antiseptiques (*C. R. Acad. Sciences*, 1883, p. 1083.)
65. CALMETTE, BOQUET et NÈGRE. — Manuel technique de microbiologie et sérologie (MASSON et C^{ie}, Paris, 1925, p. 40.)
66. — — — — — Manuel technique de microbiologie et sérologie (MASSON et C^{ie}, Paris, 1925, p. 482.)
- 66 bis. PANISSET et COURMONT. — Précis de microbiologie et des maladies infectieuses des animaux (O. DOIN, Paris, 1914, p. 252.)
67. CALMETTE, BOQUET et NÈGRE. — Manuel technique de microbiologie et sérologie (MASSON et C^{ie}, Paris, 1925, p. 484.)
68. BASSET. — Pouvoir pathogène des spores pures de la bactériidie de Davaine (*C. R. Soc. Biol.*, t. xch, 1925, p. 1515.)
69. CIENKOWSKY. — { Cités par HUTYRA et MAARECK dans leur traité
70. DETRE. — { de Pathologie médicale.
71. EICHHORN. — *Bulletin* N° 340 du Département de l'Agriculture des Etats-Unis, 27 décembre 1925.

72. CORDIER. — Notes sur les recherches sur la Bactéridie charbonneuse (*Journées Médicales tunisiennes de 1926. Rapport.*)
73. THEILER. — 13^e et 14^e Rapports du Directeur de l'Enseignement et des recherches vétérinaires de l'Union de l'Afrique Australe (1^{re} partie, octobre 1928, pp. 431-531.)
74. P. NICOLLE et A. BOQUET. — Eléments de microbiologie et d'immunologie (2^e édition O. DOIN et C^{ie}, Paris 1926.)
75. BUCHNER. — Recherches sur la sporulation de la Bactéridie charbonneuse (*Centralb. für Bakt.*, t. VIII, N° 1, 1890, p. 1.)
76. SCHREIBER. — Recherches sur la sporulation de *Bacillus anthracis* — *B. subtilis* — *B. tumescens*. (*Centralb. für Bakt. Erseke Abteilung*, pp. 353-429, t. 20, 1896.)
77. PANISSET et COURMONT. — Précis de Microbiologie et des maladies infectieuses des animaux (O. DOIN et FILS, Paris, 1914, p. 253.)
78. SEIFFERT. — Action bactéricide de la glycérine sur les microbes pathogènes (*Centralbl. für Bakt. orig.*, t. 74, 1914, pp. 644-650.)
79. VELU, BALOZET et JALABERT. — Au sujet de la technique des dilutions (*C. R. Soc. Biol.*, 19 juin 1926, p. 168.)
80. STRAUS. — Note sur l'action de la lumière solaire sur les spores de *Bacillus anthracis* (*C. R. Soc. Biol.*, t. III, 1886, p. 473.)
81. ROUX. — De l'action de la chaleur et de l'air sur les spores de la Bactéridie charbonneuse (*Ann. Inst. Pasteur*, 1887, p. 396.)
82. ARLOING. — Destruction des spores du *Bacillus anthracis* par la lumière solaire (*Semaine Médicale*, 1887, N° 10, p. 93.)
83. MOMONT. — Action de la dessiccation, de l'air et de la lumière, sur la bactéridie filamenteuse. (*Ann. Inst. Pasteur*, 1892, p. 21.)
84. J. de CHRISTMAS. — Sur le phénomène de la mort apparente du charbon asporogène (*Congrès International d'Hygiène et de dem.*, Bruxelles, 2 nov. 1905, *Bull. Inst. Past.*, 1903, t. I, p. 615.)
85. E. MORRISON et D. TETTER. — Bacterial spores a Study in heat resistance and dormancy. (*Journal of Bactér.*, nov. 1930, N° 5, p. 9.)
86. L. PANISSET, J. VERGE et CARNEIRO. — Action comparée de l'eau distillée et du sérum physiologique sur la vitalité de quelques microbes (*Ann. Inst. Pasteur*, 1925, pp. 80-85.)
87. J. CLAVERIE. — Au sujet du charbon bactérien et de la vaccination par voie intradermique en Guinée française (*Bull. Soc. Path. Exotique*, 1926, pp. 864-870.)
88. FORGEOT. — Vaccination intradermique de la chèvre contre le Charbon bactérien (*Bull. Soc. Path. Exotique*, 1927, pp. 208-209.)
89. THEILER. — « Anthrax in South Africa », par VILJSEN, CURSON-FOURIE, 13th et 14th (*Reports of the Director of Veterinary Education and Research*, octobre 1928.)

- 89 bis. VELU. — Vaccination contre le Charbon bactérien par inoculation intradermique en un temps (*Ann. Inst. Past.*, 1927, p. 615.)
90. URBAIN, LAFRANCHI, GORET, LE ROUX. — Vaccination du rat blanc contre le Charbon bactérien (*C. R. Soc. Biol.*, t. CVII, N° 24, 1931, p. 1259.)
91. FUKUDA. — Recherches sur l'infection charbonneuse chez le rat (*Analyse dans Bull. Inst. Pasteur*, 1921, t. XIX, p. 67.)
92. L. SANI. — Le chien dans la propagation du Charbon bactérien (*Rev. Génér. de Méd. Vétér.*, 1919, t. XXVIII, p. 18.)
93. MARTEL. — Le charbon du chien (*Ann. Inst. Past.*, t. XIV, 1900, p. 13.)
94. SANI. — Du Charbon expérimental chez le chien (*Clinica Veterinaria*, 1925. *Rec. Méd. Vétér.* N° 6, juin 1928, p. 349.)
95. H. EYKMAN. — Charbon suraigu chez le buffle (*Rev. Génér. Méd. Vétér.*, 1926, p. 318.)
96. REDKO. — Le Charbon bactérien chez un ours (*Bull. Soc. Path. Exot.*, juillet, 1908, p. 518.)
97. GERLACH. — Sur l'évolution d'une enzootie de fièvre charbonneuse (porc, capard, chat) (*Bull. Inst. Past.*, t. XXII, 1924, p. 617.)
98. MOUQUET. — Quelques autopsies de Charbon bactérien, le charbon chez le lion (*Bull. Inst. Past.*, 1921, t. XIX, p. 17.)
99. ROBERTSON. — *The Veterinary Journal*. Février 1909.
100. A. CHAUVEAU. — *C. R. Acad. Sciences*, t. LXXXIX, septembre 1879.
101. — — — *C. R. Acad. des Sciences*, t. XC, 28 juin 1880.
102. — — — *C. R. Acad. des Sciences*, t. XCI, 1880.
103. FORTINEAU. — Note sur le traitement du charbon par la pyocyanase (*Ann. Inst. Pasteur*, 1910, t. XXIV, p. 955.)
104. FUKUDA. — *Bull. Inst. Pasteur*, 1921, t. XIX, p. 67.
105. A. LHÉRITIER, FLEURY, TRIBOUT. — Moutons algériens et Bactérie charbonneuse (*Bull. Soc. Centrale de Médecine Vétérinaire*, 1912, p. 513.)
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	7
PRÉFACE	9

CHAPITRE PREMIER

Le matériel virulent dans les inoculations expérimentales.....	15
Historique	15
1° Inoculations avec produits virulents.....	19
a) Sang	19
b) Inoculations faites avec du liquide d'œdème.....	20
c) Inoculations faites avec des extraits d'organes.....	20
2° Inoculations expérimentales faites avec des cultures virulentes, en bouillon ou gelose.....	21
3° Inoculations expérimentales faites au moyen des 1 ^{er} et 2 ^e vaccins pasteuriens	24
4° Inoculations faites à l'aide d'un matériel nullement précisé....	27

CHAPITRE II

Choix d'un matériel virulent stable et technique de préparation.....	31
I. — Des causes diverses de la variabilité de la virulence suivant le matériel employé	33
II. — Variation de l'évolution des germes avec le milieu.....	35
1° Méthode de numération des germes.....	36
2° Action du mode d'ensemencement	41
I. — Choix d'un matériel et stabilité des émulsions sporulées..	45
Avantages du matériel sporule.....	46
II. — Obtention de cultures sporulées, choix d'un milieu.....	51
1° Choix d'un milieu	52
2° Contrôle de la sporulation.....	53
3° Variation de la teneur en peptone dans le milieu choisi....	56
4° Variation de la richesse en extrait Liebig.....	57
5° Variation de la concentration moléculaire au sein du milieu choisi	59
6° Variation de la concentration ionique dans le milieu choisi.	62

III. — Stérilisation des spores obtenues. — Destruction des germes sporules	64
1° Destruction des germes asporules, autres que la bactérie charbonneuse. — Action du sérum glycérociné.....	65
2° Destruction de la bactérie asporogène par le sérum glycérociné	70
IV. — Titrage de l'émulsion de spores charbonneuses pures....	72
1° Titrage du nombre des germes par unité de volume.....	73
2° Titrage sur les animaux réceptifs	74
V. — Conditions de conservation du matériel sporule.....	76
1° Recherche d'une température optima	77
2° Recherche sur l'influence de la lumière sur les spores en sérum glycérociné	81

CHAPITRE III

Etude de la virulence de la Bactérie charbonneuse en fonction du germe	87
--	----

CHAPITRE IV

Etude de la virulence en fonction de l'organisme infecté	95
1° Influence de l'espèce	95
2° Influence de l'individu	100
3° Influence de la race	106
4° Titrage des souches virulentes sur le mouton.....	112
CONCLUSIONS	127
BIBLIOGRAPHIE	129

